

Neue PCT-Anmeldung
Selecore GmbH
u. Z.: H2768 PCT S3

**Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit gewünschten Eigenschaften
durch Verankerung der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche Enzym-
präsentierender Organismen**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit einer gesuchten Aktivität durch die zufallsmäßige Erzeugung einer großen Sammlung von Enzymvarianten, die Synthese dieser Varianten in Wirtsorganismen, deren Präsentation auf der Oberfläche der Organismen und die Isolierung von Enzymvarianten mit den gewünschten Eigenschaften durch den Nachweis der kovalenten Deposition des Reaktionsproduktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Identifizierung von Hydrolasen mit gewünschten Eigenschaften, wobei Hydrolasevarianten auf der Oberfläche von Organismen präsentiert werden, welche mit einem zweiten Enzym, das als Hilfsenzym wirkt, dekoriert werden. Das von der Hydrolase freigesetzte Produkt ist seinerseits Substrat für das Hilfsenzym, welches das Produkt aktiviert, so dass dieses durch Kopplung an funktionelle Gruppen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus kovalent fixiert wird. Durch die Fixierung des Produktes wird der Wirtsorganismus, der die gewünschte Enzymaktivität aufweist, markiert und kann dann aus einer großen Sammlung von Organismen, die verschiedene Hydrolasevarianten exprimieren, isoliert werden. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere zur Durchmusterung großer Bibliotheken und erlaubt es, in kurzer Zeit mehrere Millionen Enzymvarianten zu testen und damit schneller und zielgerichteter als bisher möglich zu Enzymvarianten mit gewünschten Eigenschaften zu kommen.

Hydrolytische Enzyme und insbesondere Esterasen und Lipasen repräsentieren eine Klasse von Enzymen, die unverzichtbares Hilfsmittel für eine Vielzahl von Anwendungen in der organischen Chemie und Biotechnologie geworden sind. Ihr Potenzial beruht auf ihrer Fähigkeit, nicht nur die Hydrolyse, sondern auch die

Synthese vieler verschiedener Ester zu katalysieren, welche üblicherweise mit hoher Spezifität und Selektivität erfolgt. Lipasen (EC 3.1.1.3) sind Carboxylesterasen, die die Fähigkeit besitzen langkettige Acylglycerolester ($>C_{10}$) zu hydrolysieren, während Esterasen (EC 3.1.1.1) Estersubstrate kürzerkettiger Fettsäuren hydrolysieren ($<C_{10}$).

Hydrolasen, darunter vor allem Lipasen und Esterasen, werden in der Biotechnologie vor allem für die Katalyse stereoselektiver Konversionen einer Vielzahl von Aminen, sowie primären und sekundären Alkoholen eingesetzt (Rogalska et al., Biochem. Soc. Trans. 25 (1997), 161-164; Jaeger et al., FEMS Microbiol. Rev. 15 (1994), 29-63). Jedoch ist nicht für jede gewünschte Umsetzungsreaktion eine entsprechend selektive Hydrolase bekannt. Daher wurden neue Wege beschritten, Hydrolasemutanten aus natürlichen Quellen zu isolieren oder bekannte Hydrolasen so abzuwandeln, dass sie den geforderten Ansprüchen an die Selektivität und Spezifität für den kommerziellen Einsatz genügen.

Selektion, d.h. Zellkultivierung unter Bedingungen, die eine Zellvermehrung nur erlauben, wenn ein bestimmtes Enzym aktiv ist, war viele Jahre das Mittel der Wahl, um Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu isolieren. Das bisher erfolgreichste Verfahren beruht auf der Mutagenese eines Gens *in vitro*, welches für ein gewünschtes Enzym kodiert, der Einführung der mutagenisierten DNA in Zellen, um eine Bibliothek zu generieren, und schließlich der Selektion von Zellen, die ein aktives Enzym produzieren, durch Anlegen restriktiver Wachstumsbedingungen. So konstruierten z.B. Palzkill et al. (J. Bacteriol. 176 (1994), 563-568) Sammlungen großer Bibliotheken, bei denen mehrere Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitte in beta-Lactamase durch den Einsatz von *in vitro* Techniken randomisiert wurden. Die beta-Lactamase Mutantengene wurden durch Transformation in *E. coli* eingebracht. Zellen, die in der Lage waren, in Gegenwart von beta-Lactam-Antibiotika zu wachsen, welche normalerweise schlechte Substrate für beta-Lactamase sind, wurden isoliert (Venkatachalam et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), 23444-23450).

Ein Vielzahl von Techniken einschließlich chemischer Mutagenese isolierter DNA, Genamplifikation durch "Error prone" PCR und Oligonucleotid-Mutagenese wurden eingesetzt, um Bibliotheken von Mutanten-Genen zu generieren, die eine gewünschte Anzahl von Nukleotidsubstitutionen aufweisen. Häufig werden mehrere

Runden von Selektion und Mutagenese angewandt, um zunehmend verbesserte Enzyme zu selektieren.

Die Selektion verbesserter Enzyme, die in vitro konstruierten Gen-Bibliotheken entstammen, ist ein leistungsfähiges Verfahren, um Enzyme mit gewünschten Eigenschaften zu erhalten. Dieses kann allerdings nur dann eingesetzt werden, wenn das gesuchte Enzym eine essentielle und für das Überleben der Zelle notwendige Reaktion katalysiert. Leider ist es für eine Vielzahl kommerziell interessanter enzymkatalysierter Reaktionen nicht möglich, eine Selektionsstrategie zu entwickeln.

Für Enzymreaktionen, bei denen das Design einer Selektionsstrategie nicht möglich ist, müssen Bibliotheken von Mutanten durch Anwendung eines direkten Assays durchgemustert werden. Dabei wird wiederum durch Einführung von Mutationen im Gen des entsprechenden Enzyms eine Sammlung von Enzymgenen erzeugt. Durch individuelles Einbringen dieser Gene, üblicherweise im Kontext eines Expressionsplasmids, in einen mikrobiellen Expressionswirt wird damit eine Population von Mikroorganismen generiert, von denen jeder Klon im Prinzip eine bezüglich der Aminosäuresequenz variierte Enzymvariante synthetisiert. Die einzelnen Klone werden dann separat vermehrt, entweder als Kolonien auf Agarplatten oder in 96-Loch Platten. Die Wirtszellen werden lysiert und damit wird die Enzymvariante freigesetzt. Jedes einzelne Lysat wird nun mit einem vorgegebenen - häufig chromogenen - Substratmolekül inkubiert und die Umsatzreaktion vermessen. Solche Mikroorganismen, die eine Enzymvariante produzieren, welche gewünschte Verbesserungen in Hinblick auf die gesuchten enzymatischen Eigenschaften aufweist, werden anschließend vermehrt. Durch Gewinnung der für die Enzymvariante kodierenden Gensequenz und Bestimmung der Basenabfolge des gegenüber dem Wildtyp veränderten Gens kann die erhaltene Variante bezüglich ihrer Abweichungen von der Basenabfolge des ursprünglich eingesetzten Gens charakterisiert werden. Durch Anwendung dieser Strategie konnten z.B. Moore und Arnold (Nature Biotechnol. 14 (1996), 458-467) eine Variante der p-Nitrobenzylesterase isolieren, welche in 30% DMF eine 16-fach höhere Aktivität aufwies als das Ausgangsenzym.

Üblicherweise zeigt die aus einer einzigen Runde von Mutagenese und Screening erhaltene Enzymvariante zwar leichte Verbesserungen ihrer enzymatischen Eigenschaften in Richtung auf die gewünschte, prägt jedoch die gewünschte Eigenschaft noch nicht vollständig aus. Daher wird meistens ausgehend von dieser

erhaltenen Enzymvariante ein neuer Satz von Genvarianten erzeugt, und mit diesen der Prozess von Genexpression in Mikroorganismen, Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften individueller Klone und Identifizierung von in Hinblick auf die gewünschten Eigenschaften verbesserten Varianten erneut durchlaufen, solange bis die gewünschte Eigenschaft erhalten wird.

Dieses Verfahren birgt jedoch einen wesentlichen Nachteilen in sich: Es erfordert eine physikalische Separierung und Kultivierung in räumlich getrennten Kulturgefäßen (z.B. Mikrotiterplatten oder Reagensgläser) der einzelnen mikrobiellen Klone, welche zufällig veränderte Gene für das Enzym tragen und damit auch unterschiedliche Enzymvarianten produzieren. In jedem einzelnen der getrennten Kulturgefäße muss dann die enzymatischen Eigenschaft der von dem jeweiligen mikrobiellen Klon produzierten Enzymvariante gemessen werden. Dieses Verfahren ist in Bezug auf die dadurch notwendige getrennte Handhabung der mikrobiellen Klone und der getrennten Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften jedes einzelnen mikrobiellen Klones sehr aufwändig. Aus Gründen der Logistik und der Kosten kann damit immer nur ein Subsatz der tatsächlich erzeugten Genvarianten durchgemustert werden. Üblicherweise werden mehrere hundert bis mehrere 1000 Klone wie oben beschrieben in Hinblick auf die gesuchte Eigenschaft untersucht. Die Vielfalt der tatsächlich erzeugten Genvarianten ist demgegenüber aber wesentlich höher und kann über 10^9 liegen. Es ist jedoch sehr wünschenswert, möglichst viele Enzymvarianten untersuchen zu können, da sonst das Risiko besteht, dass eine Variante mit besonders günstigen Eigenschaften unentdeckt bleibt, weil sie nicht zum Ensemble der untersuchten Enzymvarianten gehört.

Das Screening von Kolonien unter Anwendung von Platten-Assays unterliegt außer der Tatsache, dass nur eine begrenzte Anzahl von Screening-Reaktionen durchgeführt werden kann, weiteren Einschränkungen: Da die weitaus größte Anzahl von Proteinen von *E. coli* - welches der am besten geeignete Wirtsorganismus für gelenkte Evolution ist - nicht freigesetzt werden, muss das Substrat in der Lage sein, in die Zellen zu diffundieren und es darf nicht toxisch sein. Außerdem zeigen Platten-Assays, auch solche, für die fluoreszierende Moleküle benutzt werden, häufig eine moderate Spezifität.

Es besteht daher die Tendenz Ultra-Hochdurchsatzverfahren zu entwickeln, die (1) in kleinem Raktionsmassstab arbeiten, (2) eine schnelle Messung der enzymatischen

Eigenschaften jedes einzelnen Klones einer mikrobiellen Population ermöglichen und mit der (3) weit mehr als die mit dem Stand der Technik mögliche Anzahl von Klonen bearbeitet werden kann. Wünschenswert ist dabei, dass die zur Testung anstehende Enzymvariante vom mikrobiellen Produzenten nicht nur synthetisiert, sondern freigesetzt wird, so dass eine direkte Interaktion mit dem Substrat stattfinden kann und außerdem nahezu beliebige Reaktionsbedingungen in Hinblick auf Wahl des Lösungsmittels, pH, Ionenkonzentration etc. geschaffen werden können.

Angestrebt wird ferner, das zu untersuchende Enzym außerhalb der produzierenden Zelle in einer Form zur Verfügung zu stellen, dass es mit der Oberfläche der produzierenden Zelle kovalent verknüpft ist. In den vergangenen Jahren wurde eine Reihe von Screening-Verfahren zur Isolierung von Enzymen mit verbesserten Eigenschaften entwickelt, die das Ziel haben, die Beschränkungen von Platten-Assays aufzuheben und die auf der Durchmusterung Oberflächen-exponierter Enzyrbibliotheken beruhen. Vielleicht die innovativste Anwendung wurde am Beispiel der Protease OmpT aus *Escherichia coli* beschrieben (Olsen *et al.*, Nat. Biotechnol. 18 (2000), 1071-1074). Dort wurde mit OmpT eine Protease aus *Escherichia coli* eingesetzt, die von sich aus ein Protein der äußeren Membran ist und damit in der äußeren Membran von *E. coli* verankert ist und eine Protease-Domäne auf der Außenseite der bakteriellen Oberfläche exponiert. Es wurde eine zufallsmäßige Sammlung von *ompT* Genvarianten erzeugt. Die operativ mit diesen verknüpften *ompT*-Varianten wurden exprimiert und die jeweilige variante enzymatische Proteindomäne auf der Oberfläche der jeweiligen, diese produzieren Bakterienzelle exponiert. Die Bakterienzellen wurden mit einem synthetischen Peptid inkubiert, welches zwei räumlich benachbarte Fluorophore trägt. Durch hydrolytische Spaltung - hervorgerufen durch eine OmpT-Variante mit der gewünschten Substratspezifität - des Peptides kommt es zur Separierung der Fluorophore und damit zu einer Änderung der Fluoreszenzeigenschaften des Produktes gegenüber dem Substrat, welches dann eine erhöhte grüne Fluoreszenz zeigt. Das freigesetzte Produkt weist eine positive Nettoladung auf, so dass es auf der (negativ geladenen) Oberfläche derjenigen Zelle, die eine Proteolyseaktivität gegenüber dem Substrat aufweist, gebunden bleibt. Damit war es möglich, durch Durchflußzytometrie grün-fluoreszierende Zellen zu isolieren, bei denen die beobachtete grüne Fluoreszenz mit einer katalytischen Aktivität der oberflächenexponierten OmpT-Proteasevariante korrelierte. Ein wesentlicher Nachteil dieses Verfahrens besteht jedoch darin, dass

das durch Umsatz mit dem Enzym freigesetzte Reaktionsprodukt lediglich durch ionogene Wechselwirkungen, auf der Oberfläche der das Substrat konvertierenden Bakterienzelle gebunden ist. Damit ist eine gewünschte permanente Kopplung des Phänotyps der enzymatischen Aktivität mit dem korrespondierenden Genotyp der diese Aktivität ausprägenden Bakterienzelle nicht gegeben. Es besteht stets das Risiko, dass sich Produktmoleküle von der Oberfläche der sie generierenden Bakterienzelle ablösen, damit in Lösung freigesetzt werden und damit auf der Oberfläche anderer, nicht die gewünschte enzymatische Aktivität ausprägendende Bakterien binden. Dadurch wird eine Identifizierung der Bakterien, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren, durch Nachweis der gebundenen Produktmoleküle erheblich erschwert. Außerdem bleibt die Bindung des Produktes an die Zelloberfläche nur unter Niedrigsalzbedingungen erhalten und das Verfahren ist nur dann anwendbar, wenn das erhaltene Produkt eine Ladung aufweist und wenn diese Ladung gegensätzlich zu der Ladung der Oberfläche der Wirtszelle ist. Darüber hinaus ist es nur auf solche Mikroorganismen anwendbar, die eine geladene Oberfläche besitzen. Ferner kann das Verfahren nicht eingesetzt werden, wenn sich die auf dem Substrat- oder Produktmolekül befindliche Ladung in ungünstiger Weise auf die Enzymreaktion auswirkt.

Es besteht daher der Bedarf, Verfahren zur Isolierung von Enzymen, insbesondere von solchen mit Substrat-spaltender Aktivität, mit gewünschten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen, die einen extrem hohen Durchsatz erlauben und eine einfache und zuverlässige Bestimmung positiver Klone erlauben.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, derartige Verfahren zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zu Identifizierung eines Enzyms mit einer gewünschten Substrat-spaltenden Aktivität, wobei eine Bibliothek, die eine Vielzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide kodiert, derart von geeigneten Wirtsorganismen exprimiert wird, dass die Kandidatenpolypeptide auf der Oberfläche der Wirtsorganismen präsentiert werden, und die Wirtsorganismen mit dem zu spaltenden Substrat in Kontakt gebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass

- (a) auf der Oberfläche der Wirtsorganismen ein Hilfsenzym bereitgestellt wird, welches die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Organismus und einem Produkt, das durch die Substratsspaltungs-Reaktion entsteht, die durch ein Kandidatenpolypeptid katalysiert wird, und
- (b) die Wirtsorganismen identifiziert werden, bei denen das Produkt auf der Oberfläche gebunden ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist besonders vorteilhaft, da es die kovalente Bindung eines Produktes der durch das Kandidatenpolypeptid katalysierten Reaktion auf der Oberfläche der Wirtsorganismus ermöglicht. Dadurch wird die Verlässlichkeit, mit der Wirtsorganismen, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren, identifiziert werden können, drastisch erhöht. Die kovalente Fixierung des Reaktionsproduktes an der Oberfläche des Wirtsorganismus erlaubt eine bessere Korrelation zwischen der Detektion der gewünschten Enzymaktivität und dem Wirtsorganismus, der diese Enzymaktivität exprimiert. Die Nachteile der im Stand der Technik beschriebenen Verfahren, bei denen das Reaktionsprodukt über ionische Wechselwirkungen an die Zelloberfläche einer Wirtszelle gebunden wird, werden vermieden. Das erfindungsgemäße Verfahren ist darüber hinaus sehr breit anwendbar, d. h. auf alle möglichen Enzymaktivitäten und Substrate, da keine Rücksicht auf die Ladungsverhältnisse des Substrats bzw. des verwendeten Wirtsorganismus genommen werden müssen.

Der Ausdruck „Enzym“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Polypeptid, das in der Lage ist, eine biochemische Reaktion zu katalysieren.

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann eingesetzt werden für die Identifizierung von Enzymen mit Substrat-spaltender Aktivität. Der Ausdruck „Substrat-spaltend“ bedeutet dabei, dass das Enzym eine Reaktion katalysiert, durch die ein vorgegebenes Substrat (Edukt) in mindestens zwei Produkte gespalten wird. Reaktionen, die zur Spaltung eines Edukts durch ein Enzym in mindestens zwei Produkte führen sind beispielsweise Hydrolyse, Phosphorolyse oder Eliminierung. Phosphorolyse ist dabei die Spaltung einer Bindung durch Orthophosphat. Hydrolyse bezeichnet eine Reaktion, bei der die Spaltung einer Bindung durch Wasser erfolgt, wobei eine OH-Gruppe in ein Produkt der Spaltungsreaktion und ein Wasserstoffatom in das andere Produkt inkorporiert wird. Eliminierung bezeichnet

eine Reaktion bei der zwei Substituenten eines Paares benachbarter Atome in einem Molekül entfernt werden, ohne dass ein Ersatz durch andere Atome oder Gruppen erfolgt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens weist daher das Enzym mit Substrat-spaltender Aktivität Hydrolase-Aktivität auf, d. h. es ist in der Lage eine Hydrolysereaktion zu katalysieren. Beispiele für Enzyme mit Hydrolase-Aktivität sind Esterasen, Lipasen, Phosphatasen, Glucosidasen, Acylasen oder Amidasen. Phosphatasen sind Hydrolasen, durch die Phosphosäuremonoester z. B. von Zuckerphosphaten, Nucleosidmonophosphaten oder als terminale Phosphatgruppe von Nukleinsäuren hydrolytisch abgespalten werden. Je nach dem pH-Wert, in dem diese Enzyme ihre optimale Wirksamkeit entfalten, unterscheidet man zwischen sauren Phosphatasen und alkalischen Phosphatasen. Glucosidasen sind Hydrolasen, die glykosidisch gebundene Glukose abspalten. Amidasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von Amiden. Acylasen sind Enzyme, welche in der Lage sind, die Abspaltung von Acylgruppen aus einem Molekül zu katalysieren. Dazu gehören z. B. Deacylasen, aber auch Lipasen.

Lipasen (E.C. 3.1.1.3) sind Carboxylesterasen, die die Fähigkeit besitzen, langkettige Fettsäureester ($\geq C_{10}$) zu hydrolysieren. Esterasen (E.C. 3.1.1.1) besitzen dagegen die Fähigkeit, Estersubstrate kürzerkettiger Fettsäuren zu hydrolysieren ($\leq C_{10}$). Hierzu gehören zum Beispiel biotechnologisch wichtige Lipasen und Esterasen, wie Phospholipasen (Lederverarbeitung), Acylasen aus *B. megaterium* und *E. coli* (chemische Synthese), Lipase aus *Aspergillus* sp. (Prostaglandinsynthese), LipA aus *B. subtilis* (Cephalosporinsynthese), Lipase aus *Candida* sp. (Pyrrolidinionsynthese), Lipase aus *C. rugosa* (Synthese von Ibuprofen), aus *Chromobacterium* (Vitamin D Synthese), aus *M. miehei* (Synthese von Ketoprofen), aus *P. cepacia* (Rapamycinsynthese), aus *P. fluorescens* (Synthese von Hydantoinen) und aus *Streptomyces* sp. (Synthese von Penicillinen).

Vorzugsweise ist das Enzym mit Esteraseaktivität abgeleitet von einer Esterase aus einem prokaryontischen Organismus, vorzugsweise einem Bakterium, besonders bevorzugt einem Bakterium der Gattung *Pseudomonas* und ganz besonders bevorzugt aus der Species *Pseudomonas aeruginosa*. Insbesondere bevorzugt ist die Esterase abgeleitet von der Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa*. Beschrieben ist dieses Enzym beispielsweise in Wilhelm et al. (J. Bacteriol. 181

(1999), 6977-6986). Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der EstA Esterase sind in Figur 4 gezeigt.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist das Enzym mit Lipaseaktivität abgeleitet von der Lipase LipA aus *Bacillus subtilis* (Eggert et al., Eur.J. Biochem. 267 (2000), 6459-6469; Van Pouderoyen et al., J. Mol. Biol. 309 (2001), 215-216; Eggert et al., FEBS Lett. 502 (2001), 89-92; Eggert et al., FEMS Microbiol. Lett. 225 (2003), 319-324).

Das Substrat, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt wird und für das ein Enzym mit entsprechender Substrat-spaltender Aktivität gesucht wird, kann im Prinzip jedes beliebige Substrat sein, das durch ein Enzym spaltbar ist. Das Substrat wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren so gewählt, dass es durch die gewünschte zu identifizierende Enzymaktivität gespalten wird. Ferner sollte dabei sicher gestellt sein, dass das Substrat lediglich der gewünschten, zu identifizierenden Enzymaktivität als Substrat dient, nicht jedoch dem gleichzeitig auf der Oberfläche des Wirtsorganismus bereitgestellten Hilfsenzym. Vorzugsweise ist es ein Substrat, das durch eine durch ein Enzym katalysierte Reaktion hydrolytisch spaltbar ist, besonders bevorzugt ist das Substrat ein Ester. Wird in dem Verfahren versucht, ein Enzym zu identifizieren, das eine Esterase oder eine Lipase ist, so ist das Substrat vorzugsweise ein Ester kürzerkettiger Fettsäuren ($\leq C_{10}$) oder ein Derivat eines solchen Esters bzw. ein langkettiger Fettsäure ($\geq C_{10}$) oder ein Derivat eines solchen Esters. Beispiele für Derivate sind z. B. halogenierte Fettsäuren, verzweigtkettige Fettsäuren, Aminosäuren oder Hydroxysäuren und viele andere.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens hat das Enzym Esterase- bzw. Lipaseaktivität und das Substrat ist ein Phenolderivat eines Esters beliebiger Carbonsäuren, d. h. ein Phenolester.

Das Substrat weist bevorzugt einen Bestandteil auf, der nach Spaltung durch die gewünschte Enzymaktivität zu einem Produkt führt, das durch das Hilfsenzym in eine aktivierte Form überführt werden kann, die dann mit Gruppen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus eine kovalente Bindung eingeht. Solche Bestandteile sind dem Fachmann bekannt, z. B. aus dem US-Patent 5,196,306, und umfassen beispielsweise Tyramin und p-Hydroxyphenylpropionylbiocytin. Im Fall eines Esters kann z. B. die Alkoholkomponente nach Spaltung durch eine Esterase durch das Hilfsenzym in ein Radikal überführt werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt das einzusetzende Substrat einen Bestandteil, der den Nachweis eines Produkts der Substratspaltungsreaktion erlaubt. Beispiele für einen solchen Bestandteil sind in der Molekularbiologie routinemäßig eingesetzte Marker, die einen Nachweis erlauben, wie z. B. Fluoreszenzmarker, Chemilumineszenzmarker, radioaktive Marker, Biotin, Avidin, Streptavidin, Antigene für Antikörper, magnetische Partikel oder ein Enzym, dass zu einem nachweisbaren Farbstoff führt bei Kontakt mit einer chromogenen Substanz. Derartige Marker und ihre Verwendungen sind dem Fachmann bekannt und sind im Zusammenhang mit der Identifizierung neuer gewünschter Enzymaktivitäten auch beschrieben in der US-Patentanmeldung 20030036092. Der Bestandteil, der den Nachweis eines Produktes der Substratspaltungsreaktion erlaubt, befindet sich dabei an dem Substrat an einer Komponente, die nach der Spaltungsreaktion durch das Hilfsenzym kovalent auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixiert wird. Wird beispielsweise ein phenolischer Ester als Substrat eingesetzt und eine Peroxidase als Hilfsenzym, so kann in dem phenolischen Ester die Alkoholfunktion mit einem detektierbaren Signalmolekül (in dem angefügten Beispiel Biotin) verknüpft sein. Das durch Hydrolyse des Esters freigesetzte Tyramid, das das Signalmolekül trägt, wird durch die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 aktiviert. Das Phenolradikal reagiert mit aromatischen Resten auf der Oberfläche des Wirtsorganismus und wird dadurch kovalent fixiert. Die Gegenwart des mit dem Signalmolekül markierten Produktes auf der Oberfläche des Wirtsorganismus kann dann mit dem Fachmann bekannten Detektionsverfahren nachgewiesen werden. Im Fall von Biotin kann der Nachweis z. B. über die Bildung von Biotin/Streptavidin-Konjugaten erfolgen. Das Streptavidin kann beispielsweise mit einem fluoreszierendem Stoff, z. B. R-Phycoerythrin, gekoppelt sein, der den Nachweis von Biotin über die Bildung der Biotin/Streptavidin-Konjugate erlaubt. Zellen, die entsprechende Fluoreszenz-markierte Konjugate auf ihrer Oberfläche aufweisen, können durch Durchflusscytometrie, z. B. durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, identifiziert und isoliert werden.

Alternativ kann auch das Substrat selber mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft werden, so dass das auf der Zelloberfläche durch das Hilfsenzym fixierte Produkt fluoreszenzmarkiert ist. Auch in diesem Fall können die fluoreszenzmarkierten Zellen

11

durch Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, identifiziert und isoliert werden.

Erfnungsgemäß wird auf der Oberfläche des Wirtsorganismus, der ein Kandidatenmolekül auf seiner Oberfläche präsentiert, ein „Hilfsenzym“ bereitgestellt. Dieses Hilfsenzym ist in der Lage, eine Reaktion zu katalysieren, welche die kovalenten Bindung eines Produktes der Spaltungsreaktion an der Oberfläche des Wirtsorganismus ermöglicht. Vorzugsweise ist das Hilfsenzym ein Enzym, das in der Lage ist, ein durch die Substratspaltungsreaktion freigesetztes Produkt in eine aktivierte Form zu überführen, die in der Lage ist, mit Gruppen, die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden sind, eine kovalente Bindung einzugehen. Solche Enzyme sind dem Fachmann bekannt und umfassen vorzugsweise jene, die in dem US-Patent 5,196,306 beschrieben sind, dessen Offenbarungsgehalt hiermit durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung inkorporiert wird. Beispiele für Hilfsenzyme sind somit Peroxidasen, Ligasen, Oxidoreductasen, Transferasen und Isomerasen. Bevorzugt sind Peroxidasen, Oxidasen, z. B. Aminooxidasen, und Transferasen. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Hilfsenzym um eine Peroxidase. Der Begriff Peroxidase bezeichnet allgemein Enzyme, die die Oxidation einer Verbindung mit Peroxid als Oxidationsmittel katalysieren.

Es kann im Prinzip jede beliebige Peroxidase in dem erfungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Beispiele sind Myeloperoxidase (McCormick et al., J. Biol. Chem. 273 (1998), 32030-32037; Myeloperoxidase aus menschlichen Leukozyten wird vertrieben durch Fluka, Sigma-Aldrich), Lactoperoxidase (Heinecke, Toxicology 177 (2002), 11-22; Ostdal et al., J. Agric. Food Chem. 48 (2000), 3939-3944; Lactoperoxidase aus Kuhmilch wird vertrieben durch Fluka, Sigma-Aldrich), Ribonuclease A bei Zusatz von Nickelionen (Gill et al., Chem. Res. Toxicol. 10 (1997), 302-309) und Peroxidase aus Meerrettich (Horseradish-Peroxidase; HRP).

Bevorzugt wird Horseradish Peroxidase (HRP) verwendet. Sie ist kostengünstig zu erhalten (z. B. Sigma, Fluka) und hat sich für eine Vielzahl biochemischer Nachweisreaktionen bewährt.

Wie oben erwähnt, ist das Hilfsenzym vorzugsweise in der Lage, ein durch die Substratspaltungsreaktion freigesetztes Produkt in eine aktivierte Form zu überführen, welche in der Lage ist, eine kovalente Bindung mit Gruppen einzugehen,

12

die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus lokalisiert sind. Solche Gruppen auf dem Wirtsorganismus umfassen insbesondere aromatische Reste, wie z. B. die Seitenketten von Tyrosin-, Tryptophan- oder Histidinresten. Unter einer „aktivierten Form“ wird dabei vorzugsweise ein hochreaktives kurzlebiges Reaktionsprodukt verstanden. Eine aktivierte Form kann z. B. ein Radikal sein. Radikale haben den Vorteil, dass sie sehr schnell durch Wassermoleküle deaktiviert werden, wenn sie nicht sofort mit Molekülen auf der Oberfläche des Wirtsorganismus reagieren. Andere aktivierte Formen sind die in dem US-Patent 5,196,306 beschriebenen. Denkbar ist z. B. auch die Verwendung einer Aminooxidase als Hilfsenzym, wenn das durch die Spaltungsreaktion freigesetzte Produkt eine freie Aminogruppe trägt. Die Aminooxidase setzt dann die freie Aminogruppe um zu einem Aldehyd, welches dann auf der Oberfläche des Organismus mit primären Aminen über eine Schiff-Basen-Bildung reagiert und eine kovalente Bindung ausbilden kann.

In analoger Weise können auch andere Oxidasen als Hilfsenzyme eingesetzt werden, die ein in der Spaltungsreaktion freigesetztes Produkt in ein Aldehyd überführen, z. B. Galactoseoxidase, die freigesetzte Galactose zum entsprechenden Aldehyd umwandelt.

Der Ausdruck „auf der Oberfläche des Wirtsorganismus bereitgestellt“ bedeutet, dass das Hilfsenzym an der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden ist. Das Hilfsenzym kann dabei gemäß bekannter Methoden auf der Oberfläche bereitgestellt werden. Möglich ist z. B. die irreversible oder die reversible Immobilisierung des Hilfsenzyms auf der Oberfläche des Wirtsorganismus. Eine irreversible Immobilisierung kann z. B. erreicht werden durch kovalente Bindung des Hilfsenzyms an Gruppen, die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhanden sind. So ist es möglich, ein Hilfsenzym, insbesondere Peroxidase, dadurch auf der Oberfläche des Wirtsorganismus zu immobilisieren, dass eine Oxidation der Zuckarseitenketten des Proteins mit Natriumperiodat und Schiff-Basreaktion der so erzeugten Zuckeraldehyde mit auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorhandenen primären Aminogruppen durchgeführt wird. Ein solches Verfahren ist z. B. beschrieben in Hermanson (Bioconjugate Techniques (1996); Academic Press, New York). Andere Möglichkeiten zur Erzeugung einer kovalenten Bindung sind dem Fachmann bekannt, z. B. durch den Einsatz von Glutaraldehyd, m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysuccinimidester, Carbodiimide oder bis-diazotiertes Benzidin. Beschrieben

sind diese und andere Verfahren zur Erzeugung kovalenter Bindungen in „Cross-linking techniques“ (Baumert und Fasold, Methods Enzymol. 172 (1989), 584-609).

Möglich ist auch die Bindung des Hilfsenzyms an die Oberfläche des Wirtsorganismus in Form eines Konjugates aus Hilfsenzym und Rezeptor, wobei der Rezeptor in der Lage ist ein Molekül zu binden, das auf der Oberfläche des Wirtsorganismus vorkommt. Ein Beispiel für einen solchen Rezeptor ist ein Antikörper, der eine Struktur, z. B. ein Protein, auf der Oberfläche des Wirtsorganismus erkennt. Dies kann z. B. ein Konjugat aus dem Hilfsenzym und einem anti-E. coli Antikörper sein, welcher Lipopolysaccharide auf der Zelloberfläche erkennt. Solche Konjugate sind kommerziell erhältlich, z. B. bei Maine Biotechnology Services Inc.. Eine andere Möglichkeit ist ein Konjugat aus einem zuckerbindenden Lektin und einem Hilfsenzym (siehe z. B. Appukuttan et al., Biochem. Biophys. 37 (2000), 77-80). Eine weitere Möglichkeit, das Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus zur Verfügung zu stellen besteht darin, dass es von dem Wirtsorganismus exprimiert wird und zwar derart, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird. Verfahren, mit denen dies erreicht werden kann, sind dem Fachmann bekannt und werden weiter unten im Zusammenhang mit der Expression der Kandidatenpolypeptide ausführlich beschrieben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist das zu identifizierende Enzym eine Esterase, das Hilfsenzym eine Peroxidase und das Substrat ist ein Phenolderivat eines Esters beliebiger Carbonsäuren, d. h. ein Phenolester. Solche Phenolester tragen eine funktionelle Gruppe, die den Nachweis der Deposition des Produktes der Esteraseaktivität auf der Oberfläche des Wirtsorganismus ermöglichen. Dabei wird von der bekannten Tatsache Gebrauch gemacht, dass Derivate von Phenol durch Peroxidase in Gegenwart von H₂O₂ durch Bildung eines phenolischen Radikals aktiviert werden, welches mit elektronenreichen Gruppen anderer Moleküle, wie z. B. Tyrosin oder Tryptophanresten, kovalente Addukte bilden. Diese Eigenschaft wurde beispielsweise ausgenutzt, um Präparate immunhistochemisch zu färben (Van Gijlswijk et al., J. Immunol. Methods. 189 (1996) 117-127; Bobrow et al., J. Immunol. Methods 125 (1989), 279-285 ; US Patente 6,593,100, 5,731,158 und 5,196,306 ; EP1129214). Dabei wird Peroxidase mit einem Rezeptor (z. B. einem Antikörper) konjugiert und diese damit über die Rezeptorbinding selektiv platziert. Nicht

gebundenes Konjugat wird abgewaschen. Dann wird ein phenolisches Substratmolekül zugesetzt, welches mit einem Signalmolekül, z. B. mit Biotin, verknüpft ist. Aufgrund der geringen Lebensdauer des durch Peroxidase aktivierten Substrates reagiert dieses in der Nähe des Ortes seiner Bildung ab und fixiert das Biotin kovalent an unmittelbar benachbarten funktionellen Gruppen (Figur 2). Der Phenolester selber ist kein Substrat für die Peroxidase. Somit kann keine Aktivierung des Phenolesters durch die Peroxidase und Deposition auf der Oberfläche des Wirtsorganismus erfolgen. Nur wenn durch die auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentierte Enzymaktivität die Säurefunktion abgespalten wird und die freie phenolische Komponente vorliegt, ist eine kovalente Bindung der phenolischen Komponente, d. h. eines Reaktionsproduktes der Enzymaktivität, auf der Oberfläche des Wirtsorganismus möglich.

Wie bereits oben beschrieben, kann das Substrat (insbesondere der Teil, der nach der Spaltungsreaktion als Produkt durch das Hilfsenzym auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixiert wird) mit einem Markermolekül versehen sein, das den Nachweis des Produkts auf der Oberfläche erlaubt. So kann der Phenolester beispielsweise mit Biotin gekoppelt sein, in der Art, dass das Biotin am Phenolrest hängt. Die Biotin-gekoppelte auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Phenolkomponente kann dann mit dem Fachmann bekannten Nachweisverfahren für Biotin detektiert werden. Möglich ist auch, an den Phenolrest des Phenolesters einen Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln, der dann den direkten Nachweis erlaubt bzw. die Isolierung von Wirtsorganismen, auf deren Oberfläche die fluoreszenzmarkierte Phenylkomponente fixiert ist. Im Fall von Zellen kommt hier die Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, in Frage. Werden als Wirtsorganismen Phagen eingesetzt, kann deren Nachweis, bzw. Anreicherung und Isolierung, z. B. durch die Adsorption an mit einem entsprechenden Rezeptormolekül beschichteten Oberflächen erreicht. Als Oberflächen kommen hier beispielsweise Plastikoberflächen (z. B. Mikrotiterplatten) oder magnetische Partikel in Betracht. Eine gängige Methode ist der Nachweis über Biotin oder Digoxigenin, wobei die starke Bindung von Biotin an Streptavidin bzw. von Digoxigenin an einen Dioxigenin-Antikörper ausgenutzt wird.

Wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren als Hilfsenzym eine Peroxidase eingesetzt, so enthält das Medium, in dem die Wirtsorganismen zur Zeit des

Inkontaktbringens mit dem Substrat vorliegen, H₂O₂, das für die enzymatische Reaktion der Peroxidase notwendig ist. Die Konzentration an H₂O₂ wird dabei so eingestellt, dass sie für die Wirtsorganismen nicht toxisch ist. Geeignete Konzentrationen liegen vorzugsweise im Bereich von 0,00005% (v/v) bis 0,005% (v/v), bevorzugt im Bereich von 0,000075% (v/v) bis 0,004% (v/v), besonders bevorzugt im Bereich von 0,00009% (v/v) bis 0,003% (v/v). Ganz besonders bevorzugt liegt die Konzentration im Bereich von 0,0001% (v/v) bis 0,001% (v/v).

Beschriebene Verfahren zur H₂O₂ vermittelten kovalenten Deposition von phenolischen Komponenten wurde bisher nur zur immunhistochemischen Färbung von fixiertem Zellmaterial, jedoch nicht mit lebenden Zellen oder anderen Organismen eingesetzt, da H₂O₂ ein starkes Zellgift ist und es zu erwarten war, dass die für eine Peroxidase-Reaktion eingesetzte H₂O₂-Konzentration mit dem Überleben der Zellen nicht vereinbaren ist. Überraschenderweise wurde gefunden, dass die Konzentration an H₂O₂ so weit eingestellt werden kann, dass sie zum einem nicht zum Zelltod führt, zum anderen aber noch eine effiziente Deposition des phenolischen Alkohols auf der Zelloberfläche zulässt. Es wurde gezeigt, dass dieses Verfahren erfolgreich angewendet werden kann, um durch die simultane Zelloberflächenexposition von Enzym (Esterase) und Hilfsenzym (Peroxidase) und den Einsatz von Phenolestern als Substrate, lebende Zellen mit der gewünschten Esteraseaktivität selektiv zu markieren und durch iterative Runden von Isolierung markierter Zellen, Vermehrung der isolierten markierten Zellen und erneute Markierung und Isolierung, Zellen mit der gewünschten Enzymaktivität aus einer Population von Zellen ohne Enzymaktivität zu isolieren.

Bei den in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Wirtsorganismen kann es sich um jede Art von Wirtsorganismen handeln, die für die Präsentation der Kandidatenpolypeptide auf ihrer Oberfläche geeignet sind. Als Wirtsorganismus kommt im Prinzip jeder Organismus in Frage, der in der Lage ist, genetische Information zu tragen, sie zu exprimieren und sich zu replizieren. So umfasst der Begriff „Organismus“ jede Art von Zellen, aber auch Viren und Phagen. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Wirtsorganismen Zellen oder Phagen.

Wenn die Wirtsorganismen Zellen sind, so kann es sich um eukaryontische oder um prokaryontische Zellen handeln. Vorzugsweise sind die Wirtszellen prokaryontische

Organismen, besonders bevorzugt Bakterien. Hierbei bevorzugt sind gram-negative Bakterien und unter diesen sind besonders bevorzugt Wirtszellen der Art *E. coli*.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Wirtsorganismen eingesetzt, die die Kandidatenpolypeptide derart exprimieren, dass sie von den Wirtsorganismen auf deren Oberfläche präsentiert werden. Dem Fachmann ist eine Vielzahl von Verfahren bekannt, eine Oberflächenexposition eines Proteins auf einem Wirtsorganismus zu erreichen. Derartige Verfahren sind z. B. bekannt unter den Begriffen „Phage display“ und „Microbial display“. Die Exposition auf der Oberfläche beruht zumeist darauf, dass durch Anwendung geeigneter gentechnischer Methoden eine Enzymvariante auf der Oberfläche des Wirtsorganismus in kovalenter Verknüpfung mit einer Komponente der Oberfläche bereitgestellt wird. Bei Verwendung von Bakterien als Wirtsorganismen wird dies z.B. dadurch erreicht, dass das Gen, welches für das Enzym kodiert, das in Hinblick auf seine Eigenschaften optimiert werden soll, operativ mit der kodierenden Sequenz für ein Protein der äußeren Membran eines mikrobiellen Produzenten verknüpft ist, so dass ein Fusionsprotein gebildet wird, welches in der äußeren Membran des Bakteriums verankert ist und die verknüpfte Proteindomäne auf der Außenseite der äußeren Membran exponiert. Als Membranverankerungsdomäne wurde unter anderem ein Fragment des *E. coli* OmpA Proteins (Francisco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993), 10444-10448), ein *Escherichia coli* Adhäsin (Maurer et al., J. Bacteriol. 179 (1997), 794-804) oder das Intimin aus enteropathogenen *E. coli* (Wentzel et al., J. Bacteriol. 183 (2001), 7273-7284) eingesetzt. Verfahren zur Präsentation von Proteinen auf der Oberfläche von *E. coli* durch die Präsentation als Fusionsproteine mit Porinen der äußeren Membran von *E. coli* wurden insbesondere beschrieben in Lang (Int. J. Med. Microbiol. 290 (2000), 579-585), Francisco et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2713-2717) und Wentzel et al. (J. Biol. Chem. 274 (1999), 21037-21043). Die Präsentation als Fusionsprotein mit einem zellulären Appendix (Fimbrium) wurde z. B. beschrieben in Westerlund-Wikstrom et al. (Protein Eng. 10 (1997), 1319-1326), Westerlund-Wikstrom (Int. J. Med. Microbiol. 290 (2000), 223-230), Kjaergaard et al. (Appl. Environ. Microbiol. 67 (2001), 5467-5473) und Schembri et al. (FEMS Microbiol. Lett. 170 (1999), 363-371). Die Präsentation als Fusionsprotein mit einem Autotransportprotein der äußeren Membran ist z. B. beschrieben in Klauser et al. (EMBO J. 11 (1992), 2327-2335) und Maurer (J. Bacteriol. 179 (1997), 794-804).

Beschrieben wurden bereits auch Verfahren zur Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche anderer Mikroorganismen als *E. coli*. So beschreiben z. B. Jung et al. (Nat. Biotechnol. 16 (1998), 576-580) und Kim et al. (Appl. Environ. Microbiol. 66 (2000), 788-793) die Zelloberflächenpräsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von *Pseudomonas syringae* durch Fusion an das Eisnucleationsprotein. Ebenso wurden bereits Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Polypeptiden in *Bacillus subtilis* (Hansson et al., Comb. Chem. High Throughput Screen. 4 (2001), 171-184) und in Staphylococcen (Lehtio et al., FEMS Microbiol. Lett. 195 (2001), 197-204) beschrieben. Auch Verfahren zur Oberflächenpräsentation von Polypeptiden auf eukaryontischen Zellen sind bereits bekannt, z. B. für *Saccharomyces cerevisiae* (Boder und Wittrup, Nat. Biotechnol. 15 (1997), 553-557; Boder und Wittrup, Methods Enzymol. 328 (2000), 430-444). Bevorzugte Verfahren zur Expression von Kandidatenpolypeptiden, die zur Präsentation der Polypeptide auf der Oberfläche von Zellen führen, sind dem Fachmann insbesondere bekannt aus der US-Patentanmeldung 20030036092 und aus Olsen et al. (Nature Biotechnology 18 (2000), 1071-1074).

Auch die Präsentation von Polypeptiden auf der Oberfläche von Phagen, das sogenannte Phagedisplay, ist bereits ausführlich beschrieben und wird vielfach angewandt (siehe z. B. Miyakubo et al. (Nucleic Acids Symp. Ser. 44 (2000), 165-166), Widersten et al. (Meth. Enzymol. 328 (2000), 389-404), Widersten und Mannervik (J. Mol. Biol. 250 (1995), 115-122), Korn et al. (Biol. Chem. 381 (2000), 179-181) und Droege et al. (J. Biotechnol. 101 (2003), 19-28)).

Das erfindungsgemäße Verfahren dient der Identifizierung von Enzymen mit einer gewünschten Substrat-spaltenden Aktivität. Es baut Verfahren auf, die im Stand der Technik bekannt sind, in denen Enzyme mit gewünschten Aktivitäten dadurch identifiziert werden, dass in Wirtsorganismen eine große Anzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide exprimiert werden und die Wirtsorganismen ermittelt werden, die die gewünschte Enzymaktivität exprimieren. Die Herstellung von solchen Wirtsorganismen erfolgt in der Regel durch die Bereitstellung von DNA-Bibliotheken, die für eine Vielzahl von Polypeptiden codieren und die Einbringung in entsprechende Wirtsorganismen. Die DNA-Bibliotheken können, z. B. hergestellt werden durch die in-vitro Mutagenese eines Ausgangsgens, welches für ein bestimmtes Enzym codiert. Durch die Mutagenese werden Varianten des Enzyms

erzeugt, die dann nach Expression in den Wirtsorganismen auf ihre enzymatischen Eigenschaften hin getestet bzw. selektioniert werden können. Geeignete Methoden zur in-vitro Mutagenese und zur Herstellung geeigneter Wirtsorganismen sind dem Fachmann bekannt und sind z. B. ausführlich beschrieben in der US-Patentanmeldung US 20030036092. Sie umfassen z. B. die chemische Mutagenese, insbesondere von isolierter DNA, Genamplifikation durch „Error prone“ PCR und Oligonukleotid-Mutagenese. Weitere Möglichkeiten sind die Ligation von randomisierten Genabschnitten (Kassettenmutagenese), Gene Shuffling, in vivo Mutagenese mit mutagenen Agenzien und die Verwendung von E. coli-Mutatorstämmen. Erfindungsgemäß wird somit in den Wirtsorganismen eine Bibliothek exprimiert, wobei diese Bibliothek eine Vielzahl von Kandidatenpolypeptiden kodiert.

Die Identifizierung der Wirtsorganismen in Schritt (b) des Verfahrens kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen wie sie z. B. beschrieben sind in der US-Patentanmeldung 20030036092. Falls das durch die Substratspaltungsreaktion hergestellte Produkt von sich aus ein Produkt ist, dass einem direkten oder indirekten Nachweis zugänglich ist, so ist die Verwendung eines Markermoleküls nicht unbedingt notwendig. Wie oben erläutert, wird in dem erfindungsgemäßen Verfahren jedoch vorzugsweise ein Substrat verwendet, das mit einem Markermolekül gekoppelt ist, das einen Nachweis des auf der Oberfläche des Wirtsorganismus gebundenen Produkts erlaubt. Beispiele für solche Marker sind oben genannt und umfassen Biotin oder Fluoreszenzfarbstoffe.

Neben der Identifizierung der Produkt-tragenden Wirtsorganismen können derartige Marker auch die Isolierung dieser Organismen erlauben. Bevorzugt wird die Isolierung ausgeführt wie in der US-Patentanmeldung 20030036092 beschrieben. Im Fall von Fluoreszenzfarbstoffen, die direkt an das Produkt gekoppelt sind, können Zellen, die ein derart markiertes Produkt auf ihrer Oberfläche tragen durch Durchflusscytometrie, z. B. Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung, isoliert werden. Dasselbe Verfahren kann angewendet werden, wenn der an das Produkt gekoppelte Marker mit einem anderen Stoff konjugiert wird, der selber fluoresziert oder mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Ein Beispiel hierfür ist die Möglichkeit, Biotin als Marker an dem Produkt zu haben und das Biotin nachzuweisen durch Streptavidin, an das ein Fluoreszenzmarker gekoppelt ist. Im Fall der Verwendung von Phagen kommt z. B. eine Isolierung über Oberflächen in Frage, die einen

Rezeptor für das verwendete Markermolekül tragen, wie bereits oben beschrieben wurde.

Eine andere Möglichkeit zur Isolierung der Wirtsorganismen, die (markiertes) Produkt an ihrer Oberfläche gebunden haben, ist die magnetische (Zell-)Sortierung. Hierfür werden die Wirtsorganismen mit magnetischen Partikeln in Berührung gebracht, die auf ihrer Oberfläche ein Molekül tragen, das das auf der Oberfläche des Wirtsorganismus fixierte Produkt bzw. den an dieses gekoppelten Marker bindet. So können z. B. solche magnetische Partikel auf ihrer Oberfläche ein Biotin-bindendes Molekül tragen (z. B. Streptavidin) und würden dann Organismen binden, die auf ihrer Oberfläche ein mit Biotin gekoppeltes Produkt tragen.

Es besteht die Möglichkeit, nach einer ersten (Zell-)Sortierung die isolierten Zellen/Organismen zu vermehren, erneut mit Substrat in Berührung zu bringen und erneut einer (Zell-)Sortierung zu unterziehen. Diese Vorgänge können mehrmals wiederholt werden, um eine Anreicherung der gewünschten Zellen/Organismen zu erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren führt im Schritt (b) zur Identifizierung von Wirtsorganismen, bei denen das Produkt der Substrat-spaltenden Aktivität auf der Oberfläche fixiert ist und die daher voraussichtlich die gewünschte Enzymaktivität exprimieren. Ausgehend von derart identifizierten Organismen kann das erfindungsgemäße Verfahren wiederholt angewendet werden.

Dazu wird die in den identifizierten Wirtsorganismen enthaltene DNA-Sequenz, die die Enzymaktivität kodiert, als Ausgangspunkt für die Erzeugung einer neuen Bibliothek verwendet, die eine Vielzahl von Kandidatenpolypeptiden kodiert. Dies kann durch dem Fachmann bekannte Mutageneseverfahren erfolgen, wie sie schon oben genannt wurden. Wirtsorganismen, die diese Bibliothek exprimieren werden dann wiederum in dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Wirtsorganismen, die ein Kandidatenpolypeptid (Enzym) derart exprimieren, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird, und die gleichzeitig auf ihrer Oberfläche ein Hilfsenzym tragen, welches in der Lage ist, eine Reaktion zu katalysieren, die die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Wirtsorganismus und einem Produkt einer Substratspaltungsreaktion, die von dem Kandidatenpolypeptid katalysiert wird. Für die bevorzugten Ausführungsformen der Wirtsorganismen, Kandidatenpolypeptide (Enzyme), Hilfsenzyme etc. gilt dasselbe,

20

was oben bereits in Zusammenhang mit dem erfindungsgemäßen Verfahren gesagt wurde.

Der Offenbarungsgehalt der im Zusammenhang mit der Beschreibung der Erfindung genannten Dokumente wird hiermit durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung inkorporiert.

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung und Illustrierung der Erfindung. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die in den Beispielen gezeigten Ausführungsformen beschränkt, sondern betrifft alle oben erläuterten möglichen Ausführungsformen.

Figur 1: Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen Verfahrens am Beispiel der Isolierung von Zellen mit Esteraseaktivität durch kovalente Deposition des Hydrolyseprodukts auf der Zelloberfläche. Im Uhrzeigersinn: Verwendung einer Bibliothek von *E. coli* Zellen, welche zufällig varierte Esterasegene tragen. Nach Induktion der Genexpression wird die Esterase auf der Zelloberfläche präsentiert. Es wird dann das Hilfsenzym Peroxidase auf der Oberfläche der Bakterien fixiert. Nicht gebundenes Enzym wird durch Zentrifugation der Bakterien und Verwerfen des Überstandes entfernt. Dann wird ein Ester-Substrat zugegeben, welches ein phenolischer Ester ist, bei dem die Alkoholfunktion mit einem detektierbaren Signalmolekül (hier Biotin) verknüpft ist. Das durch Hydrolyse des Esters freigesetzte Biotintyramid (in Figur 1 mit einem Dreieck schematisch bezeichnet) wird durch die Zelloberflächen-fixierte Peroxidase in Gegenwart von H_2O_2 aktiviert. Das Phenolradikal reagiert mit aromatischen Resten auf der Zelloberfläche und wird dadurch kovalent fixiert. Nicht abreaktierte Substratmoleküle werden durch Zentrifugation und Waschen der Zellen entfernt. Das oberflächenfixierte Signalmolekül kann direkt nachgewiesen werden, wenn es ein Fluoreszenzfarbstoff ist oder indirekt nachgewiesen werden, wie hier am Beispiel der Deposition von Biotin und dessen Nachweis durch Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat gezeigt. Damit erfolgt eine Kopplung der Esteraseaktivität der Zelle mit einem detektierbaren Zelloberflächensignal, welches die Isolierung einer Esteraseaktiven Zelle aus einer Population von Zellen, z.B. durch Anwendung von Durchflußzytometrie oder magnetischer Zellsortierung ermöglicht.

Figur 2: TSA-Reaktion (Tyrnid Signal Amplifikation). Peroxidase-vermittelte kovalente Kopplung von Biotin-Tyramid mit einem Tyrosylrest eines Proteins. Ein

Biotinmolekül, welches mit einem Phenol-Derivat verknüpft ist, wird durch Peroxidase in Gegenwart von H₂O₂ durch Bildung eines Phenylradikals aktiviert. Dieses Radikal reagiert, da es sehr kurzlebig ist, in der Nähe seines Entstehungsortes mit aromatischen Resten ab. Damit wird eine kovalente Fixierung des dektierbaren Signals – hier Biotin – erreicht.

Figur 3: Struktur von LC-LC-Biotin-Tyramid Octansäureester. Dieser Ester kann als Substratmolekül für eine Esterase eingesetzt werden. Das freigesetzte Biotintyramid kann dann durch Peroxidase in Gegenwart von H₂O₂ aktiviert werden.

Figur 4: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Esterase Gens estA aus *Pseudomonas aeruginosa* (aus Wilhelm et al., *J. Bacteriol.* 181 (1999), 6977-6986). Die kodierende Aminosäuresequenz beginnt bei Base 206. Die putative Signalsequenz ist durch einen Pfeil hervorgehoben.

Figur 5: Zelloberflächenpräsentation von EstA. Zum Nachweis der Zelloberflächen-exposition von EstA wurden induzierte *E. coli* Zellen, die das estA Gen unter lac-Promotorkontrolle exprimieren, mit anti-EstA Antikörper inkubiert und mit einem biotinylierten zweiten Antikörper und Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat angefärbt. Die Immunfluoreszenz der Zellen wurde in einem Zeiss Axioskop (Filter 15) analysiert. Links: Fluoreszenz; rechts: Durchlichtaufnahme.

Figur 6: Esterase-vermittelte Deposition von Biotin auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen. Induzierte *E. coli* Zellen, die auf ihrer Oberfläche sowohl Peroxidase, als auch EstA tragen (*E. coli* pBBX+) und gleich behandelte Kontrollzellen, die kein estA-Gen enthalten (pBBR1MCS), wurden mit dem Substrat Octansäure-Biotin-LC-LC-Tyramidester (Figur 3) in Gegenwart von 0,001 % H₂O₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellen des gleichen *E. coli* Stammes, die kein estA-Gen tragen. Die Zellen wurden nach 15-minütiger Inkubation in PBS-Puffer gewaschen und mit Streptavidin, Phycoerythrin-Konjugat angefärbt. Die Immunfluoreszenz der Zellen wurde in einem Zeiss Axioskop (Filter 15) analysiert. Links: Fluoreszenzmikroskopie; rechts: Durchlichtmikroskopie.

Figur 7: Isolierung von *E. coli* Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer Mischung mit EstA-negativen Zellen

Zur Überprüfung der Anreicherung durch magnetische Sortierung von Zellen, welche EstA-Aktivität zeigen, wurden induzierte Zellen jeder Selektionsrunde auf ihre

22

Esteraseaktivität hin überprüft. Als hydrolysierbares Standardsubstrat diente p-Nitrophenylcaprylat. Während das Ausgangsgemisch keine Esteraseaktivität zeigt, ist nach der ersten Selektionsrunde bereits eine leicht erhöhte Substrathydrolyse zu erkennen. Diese ist nach der zweiten Selektionsrunde bereits fast auf dem Niveau einer entsprechenden Probe induzierter pBBX+ Transformanten von *E. coli* JM109.

Beispiel 1:**Herstellung von *E. coli* Zellen, die Esterase auf ihrer Zelloberfläche präsentieren**

Als Beispiel wurde die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt (Wilhelm et al., *J. Bacteriol.* 181 (1999), 6977-6986). EstA ist eine Esterase aus *Pseudomonas aeruginosa*, welche aus einer aminoterminalen Zelloberflächen-exponierten Enzymdomäne und einer Membranankerdomäne besteht, welche in der äußeren Membran lokalisiert ist und eine Translokation der aminoterminalen Domäne durch die äußere Membran vermittelt. Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von EstA ist in Figur 4 gezeigt.

Die codierende Sequenz von EstA (Figur 4) wurde in den Vektor PBBX+ (Wilhelm et al., loc. cit.) eingeführt und dadurch unter Kontrolle des lac Promoters gebracht. Nach Transformation des *E. coli* Stammes JM109 (Stratagene) wurden *E. coli* Zellen erhalten, die in der Lage waren, das Esterasesubstrat Octansäure-p-Nitrophenylester zu hydrolysieren (Wilhelm et al., loc. cit.). Die Zelloberflächenpräsentation von EstA wurde durch Immunfluoreszenzfärbung der Zellen durch successive Inkubation mit anti-EstA Antikörper (aus Kaninchen), einem biotinylierten anti-Kaninchen-Antikörper und Streptavidin, Phycoerythrin Konjugat nachgewiesen. So behandelte Zellen zeigten bei Analyse im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Filter 15) eine rote Fluoreszenz (Figur 5).

Beispiel 2:**Kopplung von Horseradish Peroxidase (HRP) auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen**

10 µl Natriumperiodatlösung (0,088 M) wurden zu 100 µl Horseradish Peroxidase (10 mg/ml) gegeben. Der Ansatz wurde 1h bei Raumtemperatur im Dunkeln geschüttelt. Dann wurde das Enzym durch Gelfiltration über eine Sephadex G25 Säule vom

23

Überschuß an Natriumperiodat abgetrennt, in 2ml PBS Puffer verdünnt und bei -20°C gelagert.

Beispiel 3:**Synthese des EstA-Substrates LC-LC-Biotin-Tyramid Octansäureester**

Das EstA Substrat (Figur 3) wurde aus LC-LC-Biotin-Tyramid durch Umsetzung von 0,2 mg (1,17 µmol) Octanoylchlorid mit 0,34 mg (0,57 µmol) LC-LC-Biotin-Tyramid (Pierce) in 0,2 ml Pyridin hergestellt. Nach 60-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Reaktionsansatz lyophilisiert und in 0,1 ml Dimethylformamid aufgenommen.

Beispiel 4:**Esterase-vermittelte Deposition von Biotin auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen**

E. coli JM109 Zellen, welche das Plasmid pBBX+ trugen, wurde bei einer optischen Dichte von 0,4 mit IPTG (Endkonzentration 1mM) zur Induktion der Expression des estA Gens versetzt und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden *E. coli* JM109 Zellen verwendet, die kein estA-Gen enthalten. 500 µl der Kulturen beider Zelltypen wurden abzentrifugiert, mit oxidierte Peroxidase gekoppelt, anschließend dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen und in 500 µl 100 mM Kaliumphosphatpuffer, welcher 0,0029 µmol Biotin-LC-LC-Tyramid-Octansäureester sowie 0,001 % H₂O₂ enthielt für 15 min inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 10 µl PBS, welches 1 µl Streptavidin, R-Phycoerythrin Konjugat (Molecular Probes) enthielt resuspendiert. Nach 5 minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde ein Aliquot im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Filter 15) analysiert. Eine Deposition von Biotin-Tyramid war nur bei den Zellen mit EstA-Aktivität nachzuweisen (Figur 6).

Beispiel 5:**Isolierung von Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer 1:10⁶ Mischung mit Esterase-negativen Zellen**

Um zu überprüfen, ob es möglich ist Zellen mit Esterase-Aktivität aus einer Sammlung von Zellen ohne Esterase-Aktivität zu isolieren, wurden mit IPTG induzierte *E. coli* JM109 Zellen, die das Plasmid pBBR1MCS enthalten, welches kein estA-Gen umfasst, und JM109 Zellen, welche das Plasmid pBBX+ enthalten,

welches ein estA-Gen enthält, im Verhältnis 10⁶:1 gemischt. Das 1:10⁶-Gemisch wurde anschließend wie oben beschrieben mit dem Biotin-LC-LC-Tyramid-Octansäureester markiert. Eingesetzt wurden erneut 0,0029 µmol Substrat in 500 µl Kaliumphosphatpuffer. Die Inkubationszeit betrug wiederum 15 min. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit 500 µl PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde zu 200 µl der Zellsuspension 20 µl Streptavidin-beschichtete paramagnetischen Beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gegeben. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit je 500 µl PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 500 µl PBS resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend durch eine mit Eisenkugeln gefüllte und in ein starkes Magnetfeld eingebrachte Säule (MidiMacs, Miltenyi Biotech Bergisch Gladbach) passagiert. Die Säule wurde dreimal mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen. In der Säule zurückgehaltene Zellen wurde nach Entfernen aus dem Magnetfeld mit 2 ml PBS-Puffer eluiert. Die Zellen wurden auf Selektivplatten plattiert und über Nacht vermehrt. Am nächsten Tag wurden die Zellen abgeschwämmt und der Prozess wiederholt.

Nach einer jeden Selektionsrunde wurden die sortierten Zellen mit je 2 ml dYT von den Platten abgeerntet und neu angezogen. Dazu wurden jeweils 50 µl geerntete Zellen in 50 ml dYT-Cm²⁵ inkuliert. Nach Induktion der Kultur erfolgte die nächste Markierungs- und Sortierungsrounde. Auf diese Weise wurden drei Selektionsrunden durchgeführt

Zur Überprüfung der Anreicherungen wurden induzierte Zellen jeder Selektionsrunde auf ihre Esteraseaktivität hin überprüft. Als hydrolysierbares Standardsubstrat diente p-Nitrophenylcaprylat. Während das Ausgangsgemisch keine Esteraseaktivität zeigt, ist nach der ersten Selektionrunde bereits eine leicht erhöhte Substrathydrolyse zu erkennen. Diese ist nach der zweiten Selektionsrunden bereits fast auf dem Niveau einer entsprechenden Probe induzierter pBBX+ Transformanten von *E. coli* JM109.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung eines Enzyms mit einer gewünschten Substrat-splittenden Aktivität, wobei eine Bibliothek, die eine Vielzahl verschiedener Kandidatenpolypeptide kodiert, derart von geeigneten Wirtsorganismen exprimiert wird, dass die Kandidatenpolypeptide auf der Oberfläche der Wirtsorganismen präsentiert werden und die Wirtsorganismen mit dem zu spaltenden Substrat in Kontakt gebracht werden, dadurch gekennzeichnet, dass
 - (a) auf der Oberfläche der Wirtsorganismen ein Hilfsenzym bereitgestellt wird, welches die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche der Wirtsorganismen und einem Produkt, das durch die Substratspaltungs-Reaktion entsteht, die durch ein Kandidatenpolypeptid katalysiert wird, und
 - (b) die Wirtsorganismen identifiziert werden, bei denen das Produkt auf der Oberfläche gebunden ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Enzym Hydrolaseaktivität aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Enzym eine Esterase ist.
4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die Esterase die Esterase EstA aus *Pseudomonas aeruginosa* ist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Hilfsenzym eine Peroxidase ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Peroxidase eine Meerrettich Peroxidase ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Substrat ein Ester ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Ester ein Phenolester ist.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Substrat mit einem der Marker verbunden ist, der den Nachweis des auf der Zelloberfläche kovalent gebundenen Produktes erlaubt.

26

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei der Marker ein Fluoreszenzmarker, Chemilumineszenzmarker, radioaktiver Marker, Biotin, Avidin, magnetische Partikel oder ein Enzym ist, das zu einem nachweisbaren Farbstoff führt bei Kontakt mit einer chromogenen Substanz.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Wirtsorganismus ein Phage ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei der Wirtsorganismus eine Zelle ist.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der Wirtsorganismus ein prokaryontischer Organismus ist.
14. Verfahren Ansprache 13, wobei der prokaryontische Organismus ein gram-negatives Bakterium ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das gram-negativen Bakterium von der Art *E. coli* ist.
16. Wirtsorganismus, der ein Kandidatenpolypeptid (Enzym) derart exprimiert, dass es auf der Oberfläche des Wirtsorganismus präsentiert wird, und der gleichzeitig auf seiner Oberfläche ein Hilfsenzym trägt, welches in der Lage ist, eine Reaktion zu katalysieren, die die Ausbildung einer kovalenten Bindung ermöglicht zwischen der Oberfläche des Wirtsorganismus und einem Produkt einer Substratsspaltungsreaktion, die von dem Kandidatenpolypeptid katalysiert wird.

1/7

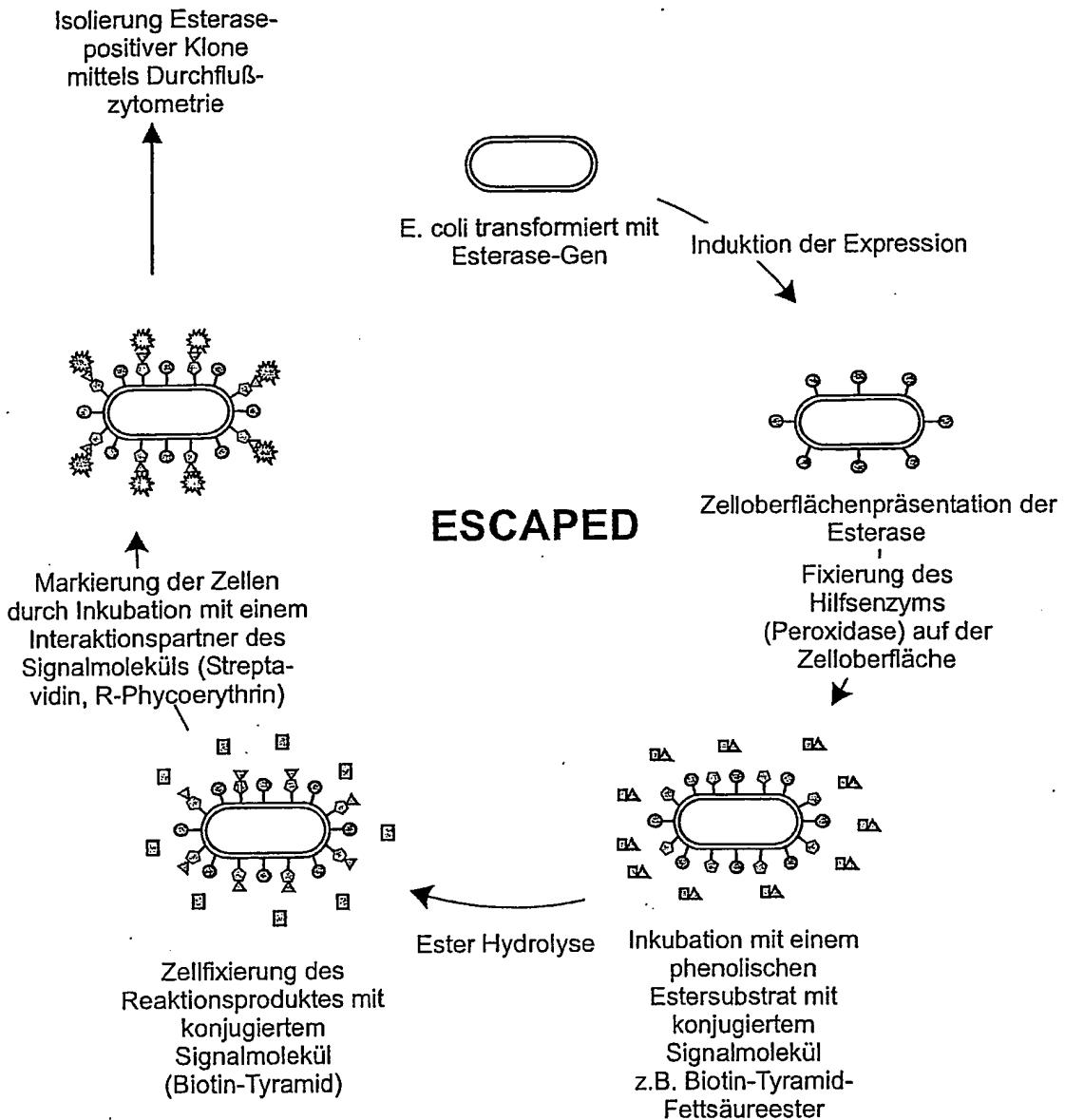


Fig 1

2/7

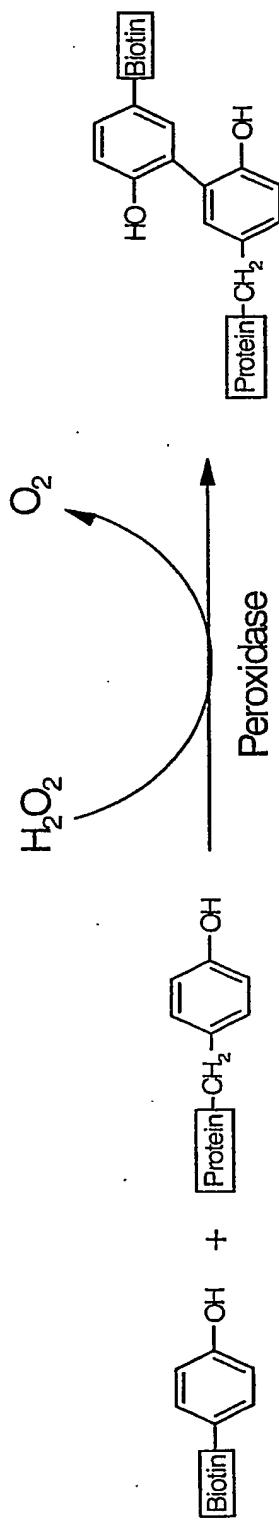


Fig. 2

3/7

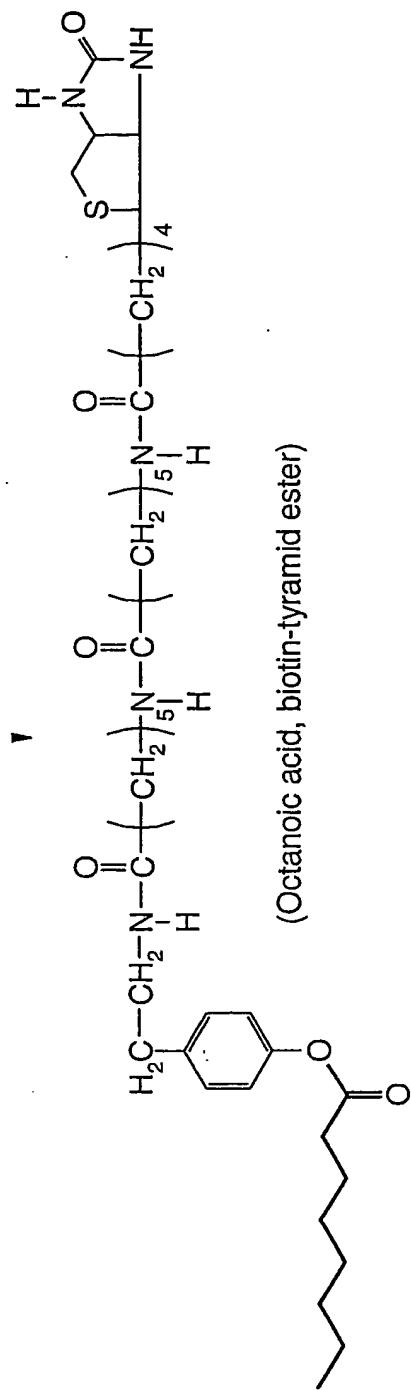


Fig. 3

P. aeruginosa EstA:

GAAGAAGATCGGCTGTGGCGGTACTCTGCTGGGGTCGCTCTGCTGGTAATAATGGCAATGAGCCT
 GCTCGTCTCTCGCCGAACAAGCCATGAGCCGGTCCCGCCTATGCTGTTGCGCTGAGGAGGCTTACG
 ACGGGCCCCGGGGCGCATGCCGACGACGCCGGCCGACAATAAAACAAATCATGGAGTAAGAGAAT
GATCAGAATGGCGCTCAAGCCACTGGTAGCGGCCTGCCTGCTGGCTTCGCTGTCACCAGGCCGAGG
TGCTCCCTCGCCCTATTGACGCTGGTGGTGGTCGGCACAGCCCTCAGCGATGCCGGCAGTTCCC
CGATCCTGCCGGCCCCGCCGAAGCACCTCGCGTTACCAACCGGGTCGGCCGACCTA
CCAGAACGGCAGCGCGAGATCTTCGGACCGACCGCGCCATGCTGCTCGGCAATCAGCT
CGGCATCGCCCCGGGTGACCTGGCTGCCCGACCTCGCCGGTCAACGCCAGCAGGGCAT
CGCCGACGGCAACAACGGCGTGGCGCTACCGGACCGATCAGATCTACGACTCGAT
CACCGCCGCCAACGGCTCGTATCGAGCGCAGAACATACCCCTCTGCGCAGCCGAGTGG
CTACCTGGTGGACCGTGCCGCCAGGGCTGGGTGCCGACCCGAACCGTTGACTACAT
CACCGGCCGGCGCAACGACTTTCTCCAGGGCGCATCCTCAACGACGTCCAGGCCAAC
GGCCGCCGGTGCCTGGTGATAGCGTGCAGGCCCTGCAGCAGGCCGGCGCTACAT
CGTGGTCTGGCTGTTGCCGACCTGGCGTACCCCGCTACCTTCGGTGGTCCCTGCAG
CCTTCGCCAGCCAACCTCAGCGGACGTTCAACGCCAGCTGACGCCAGTTGAGCCAG
GCCGGCGCCAACGTCATTCCGTTGAACATCCCGCTGCTGCTCAAGGAAGGCATGGCCAAC
CCGGCTCCTCGCCCTGGCCGCCGACCAGAACCTGATCGGCACCTGTTCAGGGCAACG
GCTGCACCATGAACCCGACCTACGGGATCAACGGCAGCACGCCGACCCGAGCAAATTGC
TGTTCAACGACAGCGTGCACCCGACCATCACCGGCCAGCGCCTGATGCCGACTACACCT
ATTCGCTGCTGTCGGCGCCCTGGAGCTGACCGTGTGCCGAAATGGCCCACGGCACCT
GCGTGCCTACCAGGACGAACTGCGCAGCCAGTGGCAGGCCAGCGCTGGACTTCAGCGA
ACGTCGGCAGTGGCGCGCTTCGTCGGCGGGTGGCAGCGCCTGGACTTCGACTCCC
AGGACAGCGCCGCCAGCGCGACGCCAACGGCTACAACCTGACCCCTGGTGGCAGCTACC
GCATCGACGAGGCTGGCGCGCCGGGTCGCCCGGTTCTACCGGAGCTGGCAGAAGCTGGAAG
CCGGCGCCAAGGATTCCGACTACCGGATGAACAGCTACATGCCAGCGCCTCGTGCAGT
ACCAGGAAAACCGCTGGTGGCGACGCCAGCGCGTTGACCGCGGCTACCTCGACTACGACG
ACCTGAAGCGCAAGTTCGCCCTGGCGCGAGCGCAGCGAGAAAGGCACACCAAC
GGCCACCTGTGGCGTTAGCGCGCGCTGGCTACGACATGCCAGCAGGCCAGACT
CCCTGGCACCTGTCGCCGTTGCTCAGCGCCACTCGCAGTACGACGACCAGAACGCGAGCTCGAAG
CGCCTGGCGCCGGCTGCAAGGAAGCAAGTACCGTTCGGCAGCGATAACCAAGCTGTTGCC
GAGTACGCCACGAACGTGAGTACGAGGACGACACCCAGGACCTGACCATGTCCTCAAC
AGCCTGCCGGCAATCGCTCACCTCGAAGGCTACACCCCGAGGACCATCTAACCGC
GTCTCACTCGGCTTCAGCCAGAAGCTGGCGCCGAGCTGCGCTGCCGGCTACAAC
TGGCGCAAGGGCGAGGACGATACCCAGCAGCGTCAGCCTGGCGCTGAGCCTGGACTTC
TGAAACGGCGGCCGGCGCCGGTGGCGCC

- AS-Sequenz:

MIRMALKPLVAACLLASLSTAPQAAPSPYSTLVVFGDSLSDAGQFPDPAGPAGSTSRTNRVG
 PTYQNGSGEIFGPTAPMLLGQLGIAPGDLAATSPVNAQQGIADGNNAVGGYRTDQIYDSI
 TAANGSLIERDNTLLRSRDGYLVDRARQGLGDPNALYYITGGNDLQGRILNDVQAQQAA
 GRLVDSVQALQQAGARYIVVVLLPDGLTPATFGGPLQPFASQLSGTFNAELTAQLSQAGAN
 VIPLNIPLLLKEGMANPASFGLAADQNLIGTCFSNGCTMNPTYGINGSTPDPSKLLFNDSVHPT
 ITGQRЛИADYTYSLLSAPWEPLLPEMAHGLRAYQDELRSQWQADWENWQNVGQWRGFVG
 GGGQRLDFDSQDSAASGDGNGYNTLGGSYRIDEAWRAGVAAGFYRQKLEAGAKDSDYRM
 NSYMASAFVQYQENRWADAALTGGYLDLKRKFALGGGERSEKGDTNGHLWAFSARL
 GYDIAQQADSPWHLSPFVSADYARVEVDGYSEKGASATALDYDDQKRSSKRLGAGLQGKYA
 FGSDTQLFAEYAHHEREYEDDTQDLTMSLNSLPGNRFTLEGYPQDHNRVSLGFSQKLAPELS
 LRGGYNWRKGEDDTQQSVSALSLDF

Fig. 4

5/7

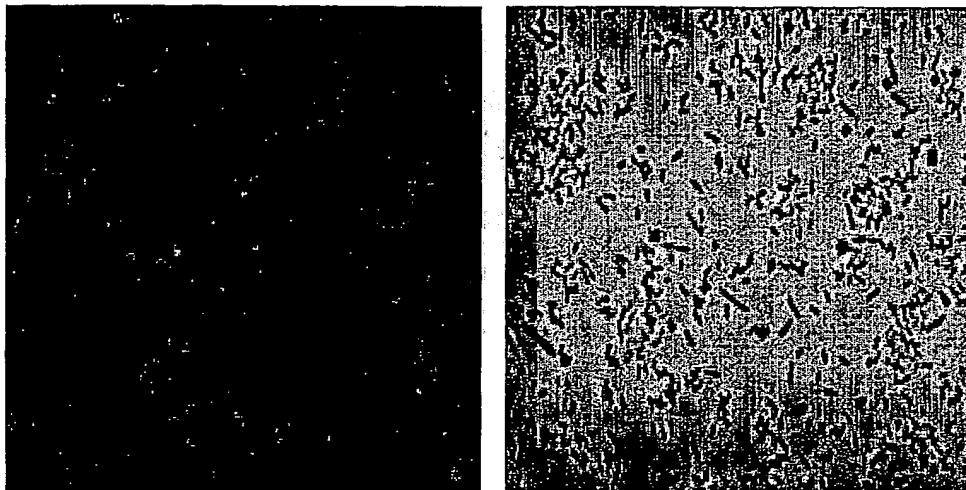


Fig. 5

BEST AVAILABLE COPY

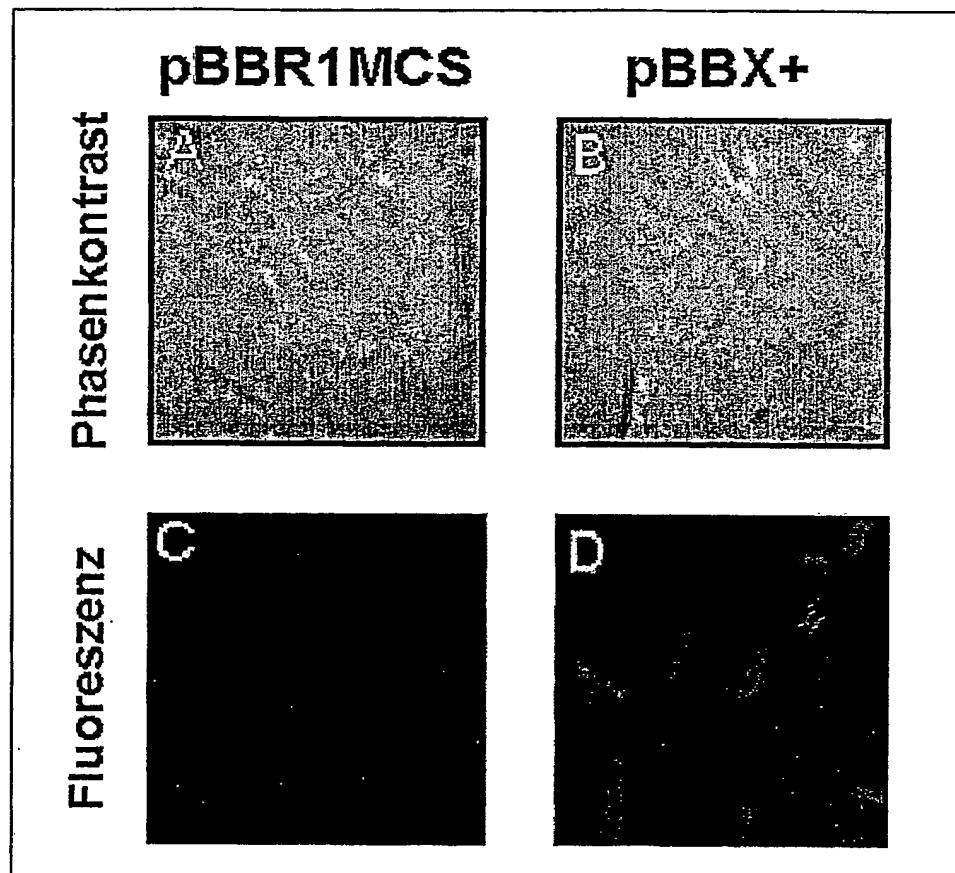


Fig. 6

BEST AVAILABLE COPY

7/7

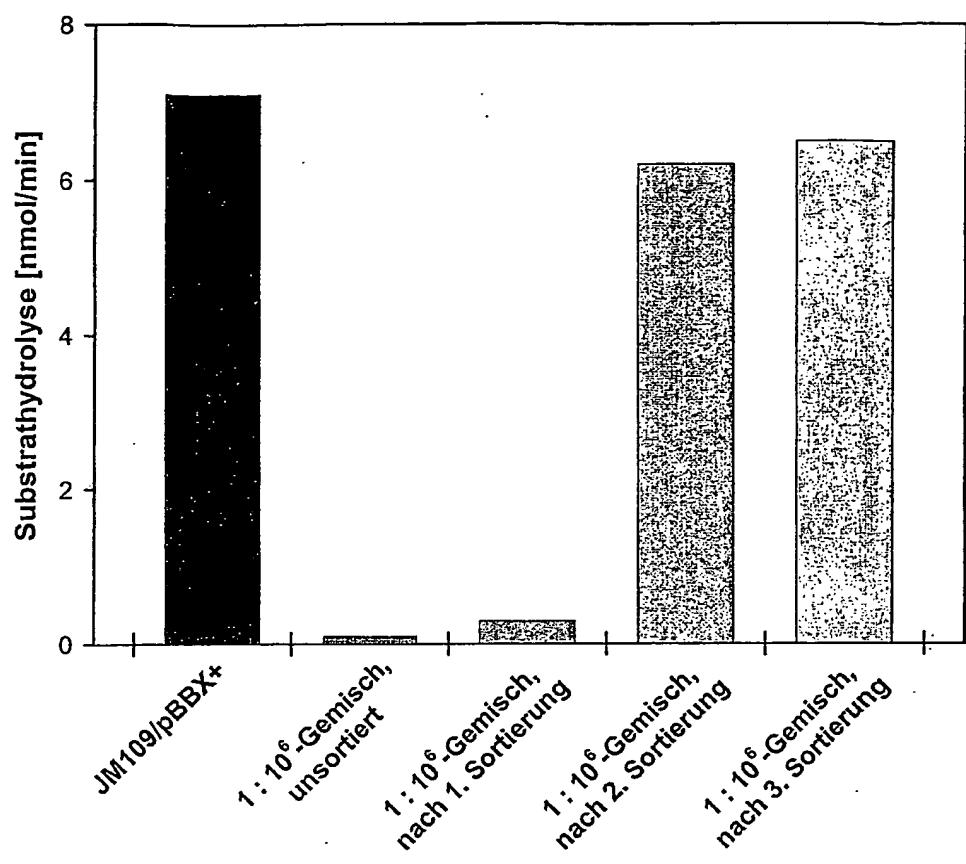


Fig. 7

SEQUENCE LISTING

<110> Seleccore GmbH

<120> Verfahren zur Identifizierung von Enzymen mit gewünschten Eigenschaften durch Verankerung der Reaktionsprodukte auf der Oberfläche Enzym-präsentierender Organismen

<130> H2768 PCT S3

<150> EP 03023953 .7

<151> 2003-10-22

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2173

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>

<221> CDS

<222> (20)

<223>

<400> 1
 gaagaagatc ggctgtggg cggtaacttct gctgggggtc gctctgctgg taataatggc 60
 aatgagcctg ctgcgttcct cgccgaacaa gccatgagcc ggttccgagc tatgctgttc
 ggctgaggag gctttacgac gggccccggg gcgcattgccg acgacgcggc ggcccgacaa 120
 taaaaacaaa tcattggagta agaga atg atc aga atg gcg ctc aag cca ctg
 Met Ile Arg Met Ala Leu Lys Pro Leu
 1 5
 gta gcg gcc tgc ctg ctg gct tcg ctg tcc acc gcc ccg cag gct gct 280
 Val Ala Ala Cys Leu Leu Ala Ser Leu Ser Thr Ala Pro Gln Ala Ala
 10 15 20 25
 cct tcg ccc tat tcg acg ctg gtg gtg ttc ggc gac agc ctc agc gat 328
 Pro Ser Pro Tyr Ser Thr Leu Val Val Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp
 30 35 40
 gcc ggg cag ttc ccc gat cct gcc ggc ccc gcc gga agc acc tcg cgt 376
 Ala Gly Gln Phe Pro Asp Pro Ala Gly Pro Ala Gly Ser Thr Ser Arg
 45 50 55
 ttc acc aac cgg gtc ggc ccg acc tac cag aac ggc agc ggc gag atc 424
 Phe Thr Asn Arg Val Gly Pro Thr Tyr Gln Asn Gly Ser Gly Glu Ile
 60 65 70
 ttc gga ccg acc gcg ccc atg ctg ctc ggc aat cag ctc ggc atc gcc 472
 Phe Gly Pro Thr Ala Pro Met Leu Leu Gly Asn Gln Leu Gly Ile Ala
 75 80 85
 ccg ggt gac ctg gct gcc tcg acc tcg ccg gtc aac gcc cag cag ggc 520

Pro Gly Asp Leu Ala Ala Ser Thr Ser Pro Val Asn Ala Gln Gln Gly			
90	95	100	105
atc gcc gac ggc aac aac tgg gcg gtg ggc ggc tac cgg acc gat cag			568
Ile Ala Asp Gly Asn Asn Trp Ala Val Gly Gly Tyr Arg Thr Asp Gln			
110	115	120	
atc tac gac tcg atc acc gcg gcc aac ggc tcg ctg atc gag cgc gac			616
Ile Tyr Asp Ser Ile Thr Ala Ala Asn Gly Ser Leu Ile Glu Arg Asp			
125	130	135	
aat acc ctc ctg cgc agc cgc gat ggc tac ctg gtg gac cgt gcc cgc			664
Asn Thr Leu Leu Arg Ser Arg Asp Gly Tyr Leu Val Asp Arg Ala Arg			
140	145	150	
cag ggc ctg ggt gcc gac ccg aac gcg ttg tac tac atc acc ggc ggc			712
Gln Gly Leu Gly Ala Asp Pro Asn Ala Leu Tyr Tyr Ile Thr Gly Gly			
155	160	165	
ggc aac gac ttt ctc cag ggg cgc atc ctc aac gac gtc cag gcc caa			760
Gly Asn Asp Phe Leu Gln Gly Arg Ile Leu Asn Asp Val Gln Ala Gln			
170	175	180	185
cag gcc gcc ggt cgc ctg gtg gat agc gtg cag gcc ctg cag cag gcc			808
Gln Ala Ala Gly Arg Leu Val Asp Ser Val Gln Ala Leu Gln Gln Ala			
190	195	200	
ggc ggc cgc tac atc gtg gtc tgg ctg ttg ccc gac ctg ggc ctg acc			856
Gly Ala Arg Tyr Ile Val Val Trp Leu Leu Pro Asp Leu Gly Leu Thr			
205	210	215	
ccg gct acc ttc ggt ccc ttg cag cct ttc gcc agc caa ctc agc			904
Pro Ala Thr Phe Gly Gly Pro Leu Gln Pro Phe Ala Ser Gln Leu Ser			
220	225	230	
ggc acg ttc aac gcc gag ctg acc gcc cag ttg agc cag gcc ggc gcc			952
Gly Thr Phe Asn Ala Glu Leu Thr Ala Gln Leu Ser Gln Ala Gly Ala			
235	240	245	
aac gtc att ccg ttg aac atc ccg ctg ctc aag gaa ggc atg gcc			1000
Asn Val Ile Pro Leu Asn Ile Pro Leu Leu Lys Glu Gly Met Ala			
250	255	260	265
aac ccg gct tcc ttc ggc ctg gcc gac cag aac ctg atc ggc acc			1048
Asn Pro Ala Ser Phe Gly Leu Ala Ala Asp Gln Asn Leu Ile Gly Thr			
270	275	280	
tgt ttc agc ggc aac ggc tgc acc atg aac ccg acc tac ggg atc aac			1096
Cys Phe Ser Gly Asn Gly Cys Thr Met Asn Pro Thr Tyr Gly Ile Asn			
285	290	295	
ggc agc acg ccc gac ccg agc aaa ttg ctg ttc aac gac agc gtg cac			1144
Gly Ser Thr Pro Asp Pro Ser Lys Leu Leu Phe Asn Asp Ser Val His			
300	305	310	
ccg acc atc acc ggc cag cgc ctg atc gcc gac tac acc tat tcg ctg			1192
Pro Thr Ile Thr Gly Gln Arg Leu Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr Ser Leu			
315	320	325	
ctg tcg gcg ccc tgg gag ctg acc ctg ctg ccg gaa atg gcc cac ggc			1240

Leu Ser Ala Pro Trp Glu Leu Thr Leu Leu Pro Glu Met Ala His Gly			
330	335	340	345
acc ctg cgt gcc tac cag gac gaa ctg cgc agc cag tgg cag gcg gac			1288
Thr Leu Arg Ala Tyr Gln Asp Glu Leu Arg Ser Gln Trp Gln Ala Asp			
350	355	360	
tgg gag aac tgg cag aac gtc ggc cag tgg cgc ggc ttc gtc ggc ggc			1336
Trp Glu Asn Trp Gln Asn Val Gly Gln Trp Arg Gly Phe Val Gly Gly			
365	370	375	
ggt ggc cag cgc ctg gac ttc gac tcc cag gac agc gcc gcc agc ggc			1384
Gly Gly Gln Arg Leu Asp Phe Asp Ser Gln Asp Ser Ala Ala Ser Gly			
380	385	390	
gac ggc aac ggc tac aac ctg acc ctt ggt ggc agc tac cgc atc gac			1432
Asp Gly Asn Gly Tyr Asn Leu Thr Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Ile Asp			
395	400	405	
gag gcc tgg cgc gcc ggg gtc gcc ggc ggt ttc tac cgg cag aag ctg			1480
Glu Ala Trp Arg Ala Gly Val Ala Ala Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Leu			
410	415	420	425
gaa gcc ggc gcc aag gat tcc gac tac cgg atg aac agc tac atg gcc			1528
Glu Ala Gly Ala Lys Asp Ser Asp Tyr Arg Met Asn Ser Tyr Met Ala			
430	435	440	
agc gcc ttc gtg cag tac cag gaa aac cgc tgg tgg gcc gac gcg gcg			1576
Ser Ala Phe Val Gln Tyr Gln Glu Asn Arg Trp Trp Ala Asp Ala Ala			
445	450	455	
ttg acc ggc ggc tac ctc gac tac gac gac ctg aag cgc aag ttc gcc			1624
Leu Thr Gly Gly Tyr Leu Asp Tyr Asp Asp Leu Lys Arg Lys Phe Ala			
460	465	470	
ctg ggc ggc gag cgc agc gag aaa ggc gac acc aac ggc cac ctg			1672
Leu Gly Gly Glu Arg Ser Glu Lys Gly Asp Thr Asn Gly His Leu			
475	480	485	
tgg gcg ttc agc gcg cgc ctg ggc tac gac atc gcc cag cag gcc gac			1720
Trp Ala Phe Ser Ala Arg Leu Gly Tyr Asp Ile Ala Gln Gln Ala Asp			
490	495	500	505
agt ccc tgg cac ctg tcg ccg ttc gtc agc gcc gac tat gca cgg gtc			1768
Ser Pro Trp His Leu Ser Pro Phe Val Ser Ala Asp Tyr Ala Arg Val			
510	515	520	
gag gtc gac ggc tat tcc gag aag ggc gcc agc gcc acc ggc ctc gac			1816
Glu Val Asp Gly Tyr Ser Glu Lys Gly Ala Ser Ala Thr Ala Leu Asp			
525	530	535	
tac gac gac cag aag cgc agc tcg aag cgc ctg ggc gcc ggc ctg caa			1864
Tyr Asp Asp Gln Lys Arg Ser Ser Lys Arg Leu Gly Ala Gly Leu Gln			
540	545	550	
ggc aag tac gcg ttc ggc agc gat acc cag ctg ttc gcc gag tac gcc			1912
Gly Lys Tyr Ala Phe Gly Ser Asp Thr Gln Leu Phe Ala Glu Tyr Ala			
555	560	565	
cac gaa cgt gag tac gag gac acc cag gac ctg acc atg tcc ctc			1960

His Glu Arg Glu Tyr Glu Asp Asp Thr Gln Asp Leu Thr Met Ser Leu			
570	575	580	585
aac agc ctg ccg ggc aat cgc ttc acc ctc gaa ggc tac acc ccg cag			2008
Asn Ser Leu Pro Gly Asn Arg Phe Thr Leu Glu Gly Tyr Thr Pro Gln			
590	595	600	
gac cat ctc aac cgc gtc tca ctc ggc ttc agc cag aag ctg gcg ccg			2056
Asp His Leu Asn Arg Val Ser Leu Gly Phe Ser Gln Lys Leu Ala Pro			
605	610	615	
gag ctg tcg ctg cgc ggc ggc tac aac tgg cgc aag ggc gag gac gat			2104
Glu Leu Ser Leu Arg Gly Gly Tyr Asn Trp Arg Lys Gly Glu Asp Asp			
620	625	630	
acc cag cag agc gtc agc ctg gcg ctg agc ctg gac ttc tgaaacggcg			2153
Thr Gln Gln Ser Val Ser Leu Ala Leu Ser Leu Asp Phe			
635	640	645	
gccggcgccc ggtcggcgcc			2173
<210> 2			
<211> 646			
<212> PRT			
<213> Pseudomonas aeruginosa			
<400> 2			
Met Ile Arg Met Ala Leu Lys Pro Leu Val Ala Ala Cys Leu Leu Ala			
1	5	10	15
Ser Leu Ser Thr Ala Pro Gln Ala Ala Pro Ser Pro Tyr Ser Thr Leu			
20	25	30	
Val Val Phe Gly Asp Ser Leu Ser Asp Ala Gly Gln Phe Pro Asp Pro			
35	40	45	
Ala Gly Pro Ala Gly Ser Thr Ser Arg Phe Thr Asn Arg Val Gly Pro			
50	55	60	
Thr Tyr Gln Asn Gly Ser Gly Glu Ile Phe Gly Pro Thr Ala Pro Met			
65	70	75	80
Leu Leu Gly Asn Gln Leu Gly Ile Ala Pro Gly Asp Leu Ala Ala Ser			
85	90	95	
Thr Ser Pro Val Asn Ala Gln Gln Gly Ile Ala Asp Gly Asn Asn Trp			
100	105	110	
Ala Val Gly Gly Tyr Arg Thr Asp Gln Ile Tyr Asp Ser Ile Thr Ala			
115	120	125	

Ala Asn Gly Ser Leu Ile Glu Arg Asp Asn Thr Leu Leu Arg Ser Arg
130 135 140

Asp Gly Tyr Leu Val Asp Arg Ala Arg Gln Gly Leu Gly Ala Asp Pro
145 150 155 160

Asn Ala Leu Tyr Tyr Ile Thr Gly Gly Asn Asp Phe Leu Gln Gly
165 170 175

Arg Ile Leu Asn Asp Val Gln Ala Gln Gln Ala Ala Gly Arg Leu Val
180 185 190

Asp Ser Val Gln Ala Leu Gln Gln Ala Gly Ala Arg Tyr Ile Val Val
195 200 205

Trp Leu Leu Pro Asp Leu Gly Leu Thr Pro Ala Thr Phe Gly Gly Pro
210 215 220

Leu Gln Pro Phe Ala Ser Gln Leu Ser Gly Thr Phe Asn Ala Glu Leu
225 230 235 240

Thr Ala Gln Leu Ser Gln Ala Gly Ala Asn Val Ile Pro Leu Asn Ile
245 250 255

Pro Leu Leu Leu Lys Glu Gly Met Ala Asn Pro Ala Ser Phe Gly Leu
260 265 270

Ala Ala Asp Gln Asn Leu Ile Gly Thr Cys Phe Ser Gly Asn Gly Cys
275 280 285

Thr Met Asn Pro Thr Tyr Gly Ile Asn Gly Ser Thr Pro Asp Pro Ser
290 295 300

Lys Leu Leu Phe Asn Asp Ser Val His Pro Thr Ile Thr Gly Gln Arg
305 310 315 320

Leu Ile Ala Asp Tyr Thr Tyr Ser Leu Leu Ser Ala Pro Trp Glu Leu
325 330 335

Thr Leu Leu Pro Glu Met Ala His Gly Thr Leu Arg Ala Tyr Gln Asp
340 345 350

Glu Leu Arg Ser Gln Trp Gln Ala Asp Trp Glu Asn Trp Gln Asn Val
355 360 365

Gly Gln Trp Arg Gly Phe Val Gly Gly Gly Gln Arg Leu Asp Phe
370 375 380

Asp Ser Gln Asp Ser Ala Ala Ser Gly Asp Gly Asn Gly Tyr Asn Leu
385 390 395 400

Thr Leu Gly Gly Ser Tyr Arg Ile Asp Glu Ala Trp Arg Ala Gly Val
405 410 415

Ala Ala Gly Phe Tyr Arg Gln Lys Leu Glu Ala Gly Ala Lys Asp Ser
420 425 430

Asp Tyr Arg Met Asn Ser Tyr Met Ala Ser Ala Phe Val Gln Tyr Gln
435 440 445

Glu Asn Arg Trp Trp Ala Asp Ala Ala Leu Thr Gly Gly Tyr Leu Asp
450 455 460

Tyr Asp Asp Leu Lys Arg Lys Phe Ala Leu Gly Gly Glu Arg Ser
465 470 475 480

Glu Lys Gly Asp Thr Asn Gly His Leu Trp Ala Phe Ser Ala Arg Leu
485 490 495

Gly Tyr Asp Ile Ala Gln Gln Ala Asp Ser Pro Trp His Leu Ser Pro
500 505 510

Phe Val Ser Ala Asp Tyr Ala Arg Val Glu Val Asp Gly Tyr Ser Glu
515 520 525

Lys Gly Ala Ser Ala Thr Ala Leu Asp Tyr Asp Asp Gln Lys Arg Ser
530 535 540

Ser Lys Arg Leu Gly Ala Gly Leu Gln Gly Lys Tyr Ala Phe Gly Ser
545 550 555 560

Asp Thr Gln Leu Phe Ala Glu Tyr Ala His Glu Arg Glu Tyr Glu Asp
565 570 575

Asp Thr Gln Asp Leu Thr Met Ser Leu Asn Ser Leu Pro Gly Asn Arg
580 585 590

Phe Thr Leu Glu Gly Tyr Thr Pro Gln Asp His Leu Asn Arg Val Ser
595 600 605

7/7

Leu Gly Phe Ser Gln Lys Leu Ala Pro Glu Leu Ser Leu Arg Gly Gly
610 615 620

Tyr Asn Trp Arg Lys Gly Glu Asp Asp Thr Gln Gln Ser Val Ser Leu
625 630 635 640

Ala Leu Ser Leu Asp Phe
645

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012017

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KLIS F. M.: "REVIEW: CELL WALL ASSEMBLY IN YEAST" YEAST, CHICHESTER, SUSSEX, GB, vol. 10, 1994, pages 851-869, XP000196331 ISSN: 0749-503X the whole document ----- SCHREUDER M.P. ET AL.: "Immobilizing proteins on the surface of yeast cells" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 14, no. 4, April 1996 (1996-04), pages 115-120, XP004035795 ISSN: 0167-7799 the whole document ----- -/-	16
X		16

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 21 March 2005	Date of mailing of the international search report 06/04/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Barz, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/012017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLSEN M.J. ET AL.: "FUNCTION-BASED ISOLATION OF NOVEL ENZYMES FROM A LARGE LIBRARY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 18, no. 10, October 2000 (2000-10), pages 1071-1074, XP001147401 ISSN: 1087-0156 cited in the application abstract; figure 1 -----	1-16
A	WO 02/34906 A (GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN) 2 May 2002 (2002-05-02) abstract; claims 1,11,12,17 page 12, lines 3-7 -----	1-16
A	MOORE J.C. ET AL.: "DIRECTED EVOLUTION OF A PARA-NITROBENZYL ESTERASE FOR AQUEOUS-ORGANIC SOLVENTS" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 14, no. 4, April 1996 (1996-04), pages 458-467, XP001148071 ISSN: 0733-222X cited in the application abstract -----	1-16
A	SAMUELSON P. ET AL.: "Display of proteins on bacteria" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 96, no. 2, 26 June 2002 (2002-06-26), pages 129-154, XP002321735 ISSN: 0168-1656 the whole document -----	1-16
A	OLSEN MARK ET AL: "High-throughput screening of enzyme libraries" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, vol. 11, no. 4, August 2000 (2000-08), pages 331-337, XP002207011 ISSN: 0958-1669 page 335; figure 3 -----	1-16
A	WILHELM S. ET AL.: "A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 181, no. 22, November 1999 (1999-11), pages 6977-6986, XP002321736 ISSN: 0021-9193 abstract -----	4
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2004/012017

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	BECKER S. ET AL.: "Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 15, no. 4, August 2004 (2004-08), pages 323-329, XP002321737 ISSN: 0958-1669 the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/012017

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0234906	A	02-05-2002	DE 10053224 A1	08-05-2002
			WO 0234906 A2	02-05-2002
			EP 1328628 A2	23-07-2003
			US 2004106118 A1	03-06-2004

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/012017

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, EMBASE, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	KLIS F. M.: "REVIEW: CELL WALL ASSEMBLY IN YEAST" YEAST, CHICHESTER, SUSSEX, GB, Bd. 10, 1994, Seiten 851-869, XP000196331 ISSN: 0749-503X das ganze Dokument	16
X	SCHREUDER M.P. ET AL.: "Immobilizing proteins on the surface of yeast cells" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 14, Nr. 4, April 1996 (1996-04), Seiten 115-120, XP004035795 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument	16 -/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kolidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfundensicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfundensicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
21. März 2005	06/04/2005
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Barz, W

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/012017

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	OLSEN M.J. ET AL.: "FUNCTION-BASED ISOLATION OF NOVEL ENZYMES FROM A LARGE LIBRARY" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 18, Nr. 10, Oktober 2000 (2000-10), Seiten 1071-1074, XP001147401 ISSN: 1087-0156 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildung 1 -----	1-16
A	WO 02/34906 A (GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT GÖTTINGEN) 2. Mai 2002 (2002-05-02) Zusammenfassung; Ansprüche 1,11,12,17 Seite 12, Zeilen 3-7 -----	1-16
A	MOORE J.C. ET AL.: "DIRECTED EVOLUTION OF A PARA-NITROBENZYL ESTERASE FOR AQUEOUS-ORGANIC SOLVENTS" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, Bd. 14, Nr. 4, April 1996 (1996-04), Seiten 458-467, XP001148071 ISSN: 0733-222X in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung -----	1-16
A	SAMUELSON P. ET AL.: "Display of proteins on bacteria" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, Bd. 96, Nr. 2, 26. Juni 2002 (2002-06-26), Seiten 129-154, XP002321735 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument -----	1-16
A	OLSEN MARK ET AL: "High-throughput screening of enzyme libraries" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB, Bd. 11, Nr. 4, August 2000 (2000-08), Seiten 331-337, XP002207011 ISSN: 0958-1669 Seite 335; Abbildung 3 -----	1-16
A	WILHELM S. ET AL.: "A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> " JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 181, Nr. 22, November 1999 (1999-11), Seiten 6977-6986, XP002321736 ISSN: 0021-9193 Zusammenfassung -----	4
		-/-

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012017

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	BECKER S. ET AL.: "Ultra-high-throughput screening based on cell-surface display and fluorescence-activated cell sorting for the identification of novel biocatalysts." CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 15, Nr. 4, August 2004 (2004-08), Seiten 323-329, XP002321737 ISSN: 0958-1669 das ganze Dokument	1-16

INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat... des Aktenzeichen

PCT/EP2004/012017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0234906	A 02-05-2002	DE 10053224 A1	08-05-2002
		WO 0234906 A2	02-05-2002
		EP 1328628 A2	23-07-2003
		US 2004106118 A1	03-06-2004